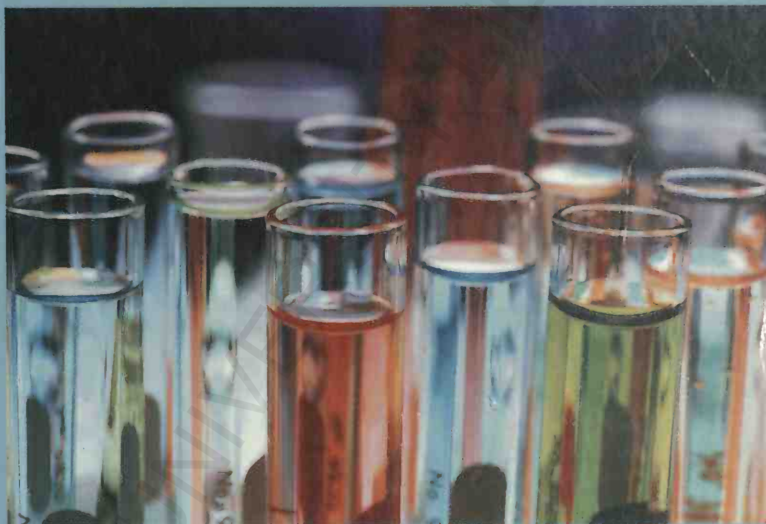
Vlad
ARTENIE
Eugen
UNGUREANU
Anca Mihaela
NEGURĂ



METODE DE INVESTIGARE A METABOLISMULUI GLUCIDIC ȘI LIPIDIC



Editura PIM

CUPRINS

SECURITATEA MUNCII ÎN LABORATORUL DE BIOCHIMIE ---------- I – VI
I.1. DOZAREA GLUCIDELOR SOLUBILE ---------- 1
I.1.1. Dozarea monoglucidelor şi oligoglucidelor reducătoare în plante ---------- 1
I.1.2. Dozarea zaharozei în plante ---------- 6
I.1.3. Dozarea glucozei în sânge (micrometoda colorimetrică cu orto-toluidină) ---------- 8
I.1.4. Dozarea fructozei în plante ---------- 11
I.1.5. Dozarea hexozaminelor în serul sanguin ---------- 13
I.1.6. Dozarea acidului sialic în serul sanguin ---------- 15
I.1.7. Dozarea lactozei în lapte ---------- 16
I. 1. 8. Determinarea glucidelor solubile prin cromatografie în strat subţire ---------- 18
I.2. DOZAREA UNOR POLIGLUCIDE ---------- 21
I.2.1. Dozarea amidonului în plante ---------- 21
I.2.2. Determinarea cantitativă a glicogenului în ţesuturile animale ---------- 23
I.2.3. Dozarea mucopolizaharidelor în serul sanguin ---------- 26
I.3. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII UNOR ENZIME PARTICIPANTE ÎN ANABOLISMUL ŞI CATABOLISMUL GLUCIDELOR ---------- 27
I.3.1. *Enzime implicate în scindarea poliglucidelor şi oligoglucidelor* ---------- 27
I.3.1.1. Determinarea activităţii amilazelor ---------- 27
I.3.1.1.1. Determinarea activităţii α-amilazei în serul sanguin şi urină (micrometoda Metais şi Bieth) ---------- 28
I.3.1.1.2. Determinarea activităţii α-amilazei în salivă (micrometoda Metais şi Bieth, adaptată de Vlad Artenie) ---------- 32
I.3.1.1.3. Determinarea activităţii α-amilazei şi β-amilazei în plante (metoda Noelting-Bernfeld, modificată parţial de Vlad Artenie) ---------- 35
I.3.1.1.4. Determinarea activităţii α-amilazei şi β-amilazei sintetizate de microorganisme (metoda Noelting-Bernfeld) ---------- 40
I. 3. 1. 1. 5. Determinarea activităţii γ-amilazei ---------- 41

I.3.1.1.6. Evidenţierea izoenzimelor α-amilazei şi β-amilazei cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă (metoda Vlad Artenie şi Marius Mihăşan) ---------------------- 43

I.3.1.2. Determinarea activităţii α - glucan fosforilazei vegetale ---------------------- 46

I.3.1.3. Determinarea activităţii unor glicozidaze ---------------------- 50

I.3.1.3.1. Determinarea activităţii α - glucozidazei (protocolul Worthington, adaptat de Vlad Artenie) ---------------------- 50

I.3.1.3.2. Determinarea activităţii β - D - galactozidazei ---------------------- 52

I.3.1.3.3. Determinarea activităţii β - fructofuranozidazei ---------------------- 55

I.3.1.3.3.1. Determinarea activităţii β - fructofuranozidazei intestinale (metoda I. S. Lukomskaja, modificată de Vlad Artenie) ---------------------- 55

I.3.1.3.3.2. Determinarea activităţii β - fructofuranozidazei levuriene ---------------------- 57

I.3.2. *Enzime care catalizează diferite etape din metabolismul intermediar al monoglucidelor* ---------------------- 59

I.3.2.1. Determinarea activităţii fosfomonoesterazelor ---------------------- 59

I.3.2.1.1. Determinarea activităţii fosfomonoesterazelor alcalină şi acidă în serul sanguin ---------------------- 60

I.3.2.1.1.1. Determinarea activităţii fosfomonoesterazei alcaline (metoda Bodansky) ---------------------- 60

I.3.2.1.1.2. Determinarea activităţii fosfomonoesterazei alcaline Metoda cu para – nitrofenilfosfat (Metoda Bessey, Lowry, Brock modificată) ---------------------- 62

I.3.2.1.1.3. Determinarea activităţii fosfomonoesterazei acide ---------------------- 64

I.3.2.1.1.4. Determinarea activităţii fosfomonoesterazei acide în plante ---------------------- 66

I.3.2.2. Determinarea activităţii glucozofosfat izomerazei ---------------------- 69

I.3.2.2.1. Determinarea activităţii glucozofosfat izomerazei în serul sanguin (metoda Bodansky cu unele modificaţii ale lui Korovkin) ---------------------- 69

I.3.2.3. Determinarea activităţii fructozobisfosfat aldolazei în serul sanguin (metoda Kulganek şi Klaska) ---------------------- 72

I.3.2.4. Determinarea activităţii lactat dehidrogenazei ---------------------- 74

I.3.2.4.1. Determinarea activităţii lactat dehidrogenazei în serul sanguin (metoda Sevela şi Tovarek în modificaţia lui Korovkin, după Vlad Artenie şi Elvira Tănase) ---------------------- 74

I.3.2.4.2. Determinarea activităţii lactat dehidrogenazei în serul sanguin (metoda Wroblewski şi La Due, modificată de Hill, după Vlad Artenie şi Elvira Tănase) ---------------------- 76

I.3.2.4.3. Determinarea activităţii izoenzimelor lactat dehidrogenazei ---------------------- 77

I.3.2.4.3.1. Determinarea izoenzimelor lactat dehidrogenazei în serul sanguin, prin adsorbţie pe DEAE-Sephadex (după Manta, Cucuianu, Benga, Hodârnău) ---------------------- 78

I.3.2.4.3.2. Determinarea izoenzimelor LDH prin inactivare termică ---------------------- 78

I.3.2.4.3.3. Determinarea activităţii fracţiunii lactat dehidrogenazei serice stabilă la uree ---------------------- 79

I.3.2.4.3.4. Separarea şi identificarea izoenzimelor lactat dehidrogenazei prin electroforeză în gel de poliacrilamidă ---------------------- 80

I.3.2.5. Determinarea activităţii alcool dehidrogenazei ---------------------- 83

I.3.3. *Enzime participante la oxidarea biologică a substratelor organice* ---------------------- 85

I.3.3.1. Determinarea activităţii succinat dehidrogenazei (metoda Harish Padh - adaptată de Vlad Artenie) ---------------------- 85

I.3.3.2. Determinarea activităţii dehidrogenazei acidului succinic (metoda cu trifeniltetrazoliu) ---------------------- 87

I.3.4. *Enzime implicate în etapa finală a oxidării biologice* ---------------------- 88

I.3.4.1. Determinarea activităţii adenozintrifosfatazei ---------------------- 88

I.3.4.1.1. Determinarea activităţii ATP-azei în ţesuturile animale ---------------------- 89

I.3.4.1.2. Determinarea activităţii ATP-azei în plante ---------------------- 91

I.3.4.2. Determinarea activităţii catalazei ---------------------- 93

I.3.4.2.1. Determinarea activităţii catalazei în sânge (metoda Bach-Zubkova) ---------------------- 93

I.3.4.2.2. Determinarea activităţii catalazei în plante prin titrare iodometrică (metoda J. B. Sumner şi G. F. Somers, modificată de Vlad Artenie) ---------------------- 94

I.3.4.2.3. Determinarea spectrofotometrică a activităţii catalazei (metoda Sinha) ---------------------- 97

I.3.4.3. Determinarea activităţii peroxidazei (metoda L. V. Gudkova şi R. G. Degtiari) ---------------------- 100

I.3.4.4. Determinarea activităţii glutation peroxidazei ---------------------- 103

I.3.4.4.1. Determinarea activităţii glutation peroxidazei în serul sanguin (metoda Fukuzawa şi Tokumura, adaptată de Costel Darie şi Vlad Artenie) ---------------------- 103

I.3.4.4.2. Determinarea activităţii glutation peroxidazei în ţesuturile animale (metoda Fukuzawa şi Tokumura) ---------------------- 105

I.3.4.5. Determinarea activităţii superoxid dismutazei (metoda Winterbourn, Hawkins, Brian şi Carrell adaptată de Vlad Artenie) ---------------------- 108

I.3.4.6. Determinarea activităţii ascorbat oxidazei în plante (metoda M. F. Oberbacher şi H. M. Vines) ---------------------- 111

I.4. DOZAREA UNOR PRODUŞI INTERMEDIARI ŞI FINALI AI METABOLISMULUI GLUCIDIC ---------------------- 113

I.4.1. Dozarea acidului piruvic ---------------------- 113

I.4.2. Dozarea acidului lactic (metoda Barker şi Summerson modificată) ---------------------- 116

I.4.3. Determinarea cantitativă a alcoolului etilic (metoda Martin – Boiden) ---------------------- 120

I.4.4. Determinarea cantitativă a dioxidului de carbon (metoda STAS) ---------------------- 123

I.4.5. Dozarea acidului adenozintrifosforic (ATP) în ţesuturile vii ---------------------- 125

II.1. DOZAREA LIPIDELOR TOTALE ---------------------- 127

II.1.1. Dozarea lipidelor totale în ţesuturile animale (metoda Folch şi colaboratorii, modificată de I. F. Dumitru) ---------------------- 127

II.1.2. Dozarea lipidelor totale în serul sanguin (metoda cu reactivul sulfofosfovanilic) ---------------------- 129

II.2. ANALIZA TRIACILGLICEROLILOR ---------------------- 131

II.2.1. Determinarea cantitativă a triacilglicerolilor în plante ---------------------- 131

II.2.1.1. Determinarea cantitativă a triacilglicerolilor în plante (metoda Soxhlet indirectă) ---------------------- 131

II.2.2. Dozarea triacilglicerolilor în serul sanguin (metoda Tixier şi Claude) ---------------------- 134

II.2.3. Determinarea indicelui de aciditate ---------------------- 137

II.2.4. Determinarea indicelui de saponificare ---------------------- 139

II.2.5. Determinarea indicelui de iod (metoda Hanus) ---------------------- 142

II.2.6. Metode de determinare a unor produşi rezultaţi în oxidarea peroxidică a lipidelor în organismele vii ---------- 145

II.2.6.1. Determinarea indicelui peroxidic ---------- 145

II.2.6.2. Determinarea spectrofotometrică a conjugării dienice a acizilor graşi superiori nesaturaţi (metoda I. D. Stalinaja) ---------- 148

II.2.6.3. Determinarea cantitativă a dialdehidei malonice cu ajutorul acidului tiobarbituric ---------- 149

II.2.6.3.1. Dozarea malon dialdeidei în serul sanguin (adaptată după metoda Phelps S., Harris W.,1993 şi metoda Truţia Eugen et al., 1999) ---------- 150

II.2.6.3.2. Dozarea malon dialdehidei în ţesuturile animale (adaptată după metoda Dobrian A. D. et al., 2001) ---------- 151

II.2.6.4. Determinarea indicelui benzidinic ---------- 153

II.3. ANALIZA STERIDELOR ---------- 154

II.3.1. Dozarea colesterolului liber şi total în serul sanguin ---------- 154

II.4. ANALIZA GLICEROFOSFATIDELOR ŞI SFINGOFOSFATIDELOR ---------- 157

II.4.1. Determinarea cantitativă a fosfolipidelor totale din serul sanguin ---------- 157

II.4.2. Separarea lipidelor din membranele biologice prin cromatografia în strat subţire ---------- 159

II.5. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A LIPOPROTEINELOR SERICE (METODA KUNKEL) ---------- 161

II.6. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII UNOR ENZIME IMPLICATE ÎN METABOLISMUL LIPIDELOR ---------- 162

II.6.1. Determinarea activităţii lipazei ---------- 162

II.6.1.1. Determinarea activităţii lipazei vegetale ---------- 162

II.6.1.2. Determinarea activităţii lipazei din ţesuturile animale ---------- 165

II. 7. DOZAREA UNOR PRODUŞI INTERMEDIARI ŞI FINALI AI METABOLISMULUI LIPIDELOR ---------- 166

II.7.1. Dozarea acizilor graşi liberi în serul sanguin ---------- 166

II.7.2. Dozarea corpilor cetonici în sânge (metoda W. Neuweiler) ---------- 168

ANEXĂ ---------- 171

BIBLIOGRAFIE ---------- 181

SECURITATEA MUNCII ÎN LABORATORUL DE BIOCHIMIE

În laboratoarele de biochimie activitatea este în general ferită de accidente, în cazul în care se lucrează atent şi corect. Accidentele pot surveni din neglijenţa celor care lucrează. Acestea pot fi:

- ✓ intoxicaţii datorate pătrunderii unor substanţe toxice în organism pe calea aparatului respirator, prin tubul digestiv, sau prin piele; intoxicaţiile pot fi acute, atunci când toxicul pătrunde într-un timp scurt şi în cantitate ce depăşeşte doza limită, sau cronice, prin acumularea unor doze mici dar repetate în timp;
- ✓ arsuri produse fie prin efect termic, fie prin efectul unor substanţe caustice (baze puternice) sau acizi (acizi anorganici tari, acid acetic etc.);
- ✓ traumatisme provocate de explozii (de butelii, de vase sub presiune), tăieturi cu sticlă sau loviri;
- ✓ electrocutări ce pot surveni ca urmare a mânuirii incorecte a aparaturii electrice, sau ca urmare a incorectei izolări sau nelegării la pământ a aparatelor;
- ✓ boli transmisibile datorate înghiţirii sau inhalării produselor infectate sau prin contact;
- ✓ muşcături ale animalelor de laborator;
- ✓ iradiere cu radioizotopi.

Organizarea şi controlul activităţii de laborator cu studenţii

Îndrumătorul lucrărilor practice are sarcina de a instrui şi de a examina periodic studenţii ce lucrează în laboratorul respectiv asupra normelor de tehnica securităţii muncii, de a verifica respectarea instrucţiunilor, de a propune sancţiuni în caz de nerespectare a acestora şi de a supraveghea îndeaproape desfăşurarea activităţilor în locurile periculoase.

Conducătorul laboratorului are sarcina de a semnala deficienţele din punct de vedere al protecţiei muncii ce nu pot fi rezolvate cu forţe proprii, de a se îngriji de completarea truselor de prim ajutor cu elementele necesare acestor truse.

Păstrarea ordinii şi disciplinei reprezintă o problemă esenţială a protecţiei muncii.

Înainte de a se începe lucrul la o instalaţie de laborator se vor elabora de către conducătorul de lucrări instrucţiunile de lucru pentru fiecare loc de muncă în parte.

Este categoric interzis lucrul fără completarea fişei de protecţia muncii semnată şi prelucrată în faţa întregului colectiv.

La terminarea lucrărilor, este obligatoriu să se verifice:

✓ dacă sunt închise conductele de gaz şi robinetele de apă;

✓ dacă sunt stinse becurile de gaz, electrice, precum şi aparatele electrice sau cu foc deschis;

✓ dacă sunt închise bine buteliile cu gaze;

✓ dacă sistemul de ventilaţie este în bună stare de funcţionare.

Amenajarea şi dotarea laboratoarelor

Laboratoarele trebuie să fie situate într-un spaţiu adecvat, prevăzut cu instalaţii utilitare (energie electrică, apă curentă, canalizare, reţea de gaze naturale) care să permită buna desfăşurare a activităţii de laborator în condiţii optime.

Ferestrele trebuie să fie mari pentru a permite o ventilaţie bună în condiţii de urgenţă. Culoarele trebuie să fie suficient de largi pentru a fi posibilă circulaţia cărucioarelor.

Este interzisă depozitarea materialelor şi executarea operaţiilor pe culoare.

Reţeaua de gaze a laboratorului trebuie să aibă un ventil central ce să poată permite oprirea centralizată a gazelor în tot laboratorul.

Pentru a evita recircularea aerului viciat este necesară admisia aerului din exterior. Instalaţia de ventilaţie a aerului din încăperi va fi separată de instalaţia de ventilaţie pentru nişe.

Este necesar ca în fiecare laborator să se găsească nişe prevăzute cu instalaţie de gaz, de apă şi de canalizare, cu o bună ventilaţie, fiind menţinute în bună stare de funcţionare.

Toate lucrările în care se folosesc substanţe deosebit de toxice se vor executa numai sub nişe.

Nu se admite să se lucreze cu lichide inflamabile sub nişe ce nu au ventilaţie bună. Nu se admite încărcarea nişei cu vase, aparate şi utilaje de laborator, în afară de cele ce sunt necesare la efectuarea lucrării respective. În nişe se va păstra tot timpul ordinea şi curăţenia.

Mesele de laborator vor fi construite din material antiacid şi vor fi prevăzute cu toate anexele necesare (apă, canalizare, gaze şi instalaţie electrică). Anexele meselor de laborator vor fi dispuse în aşa fel încât să uşureze cât mai mult munca având comenzile în general fixate în faţa lor.

Tehnica de lucru

Generalități. Înainte de începerea lucrărilor se aranjează ținuta de lucru (halat, mănuși, ochelari de protecție etc.) și se așează în ordine pe masa de lucru toate materialele de care este nevoie. Nu se recomandă a se pune pe masă alte materiale decât cele strict necesare lucrării respective.

Lucrările practice se vor realiza cu cantitățile de substanțe și concentrațiile indicate de referatul lucrării sau cu cele indicate de cadru didactic îndrumător.

Înainte de punerea în exploatare a unei instalații de laborator sau de începerea lucrului la un aparat, studentul va trebui să prezinte cadrului didactic îndrumător principiul și modul de funcționare al aparatului sau instalației, ceea ce va certifica cunoașterea de către student a ordinii operațiilor care vor trebui executate.

Este interzisă lăsarea deschisă a recipientelor cu reactivi sau să se schimbe dopurile de la un recipient la altul. Fiecare sticlă va purta etichetă pe care va fi trecută corect formula substanței conținute. Dacă este vorba de soluții va fi trecută obligatoriu și concentrația acestora. La turnarea reactivilor din sticle se va evita prelingerea pe vas a reactivului care ar putea cauza distrugerea etichetei.

Lucrările de laborator se vor executa numai cu sticlărie curată, iar la terminarea lucrărilor vasele utilizate se vor spăla și se vor lăsa în ordine.

Pe mesele de lucru nu se vor lăsa materiale și cele folosite se vor pune la locurile lor. Pot fi lăsate pe mese doar aparatele ce vor fi utilizate a doua zi.

Este STRICT INTERZISĂ gustarea substanțelor și soluțiilor, precum și mirosirea acestora fără precauții. Pentru mirosirea substanțelor se procedează prin ținerea la distanță a vasului și vaporii sunt direcționați spre nas cu ajutorul mâinii.

În timpul desfășurării lucrărilor se va evita cu strictețe aplecarea asupra unui vas în care fierbe un lichid oarecare și, de asemenea, se va evita cu strictețe orientarea unui asemenea vas către o altă persoană.

Pipetarea soluțiilor toxice sau a celor infectate se va face cu o pipetă automată sau folosindu-se para de cauciuc atașată pipetei cu care se lucrează.

În cazul lucrului cu substanțe sau materiale de proveniență animală sau umană ce ar putea fi infectate se vor folosi mănuși de protecție și pipete automate sau pipete cu pară de cauciuc pentru a se evita contactul direct cu materialul potențial periculos.

Manipularea sticlăriei. Vasele din sticlă folosite la determinările practice nu trebuie să prezinte zgârieturi, plesnituri, bule de aer incluse în masa sticlei sau alte defecţiuni vizibile.
Încălzirea vaselor de sticlă se va face cu atenţie, treptat, fie pe baie de apă, nisip sau ulei, fie pe site metalice prevăzute cu placă de azbest pe toată suprafaţa de contact dintre vasul de sticlă şi sită. Aparatura din sticlă pusă la încălzit se va supraveghea pe toată durata încălzirii ei.

Ustensilele fierbinţi se apucă după caz, fie cu o cârpă uscată, fie cu un cleşte de lemn sau metalic. Vasele de sticlă se vor feri de şoc termic (cele fierbinţi nu se vor aşeza pe locuri reci sau umede).

Manipularea dispozitivelor de încălzire. Deoarece majoritatea laboratoarelor folosesc încălzirea cu gaze naturale, pentru evitarea accidentelor trebuie respectate instrucţiunile de manipulare. Pentru aprinderea flăcării de gaz se va aprinde întâi chibritul în dreptul orificiului de ieşire a gazului apoi se va deschide robinetul de gaz. Dacă aprinderea se produce în interior, robinetul se va închide imediat.

Se interzice aprinderea becurilor de gaz cu ajutorul unor bucăţi de hârtie plimbate de la o masă la alta.

Nu se vor lăsa niciodată becuri de gaz aprinse nesupravegheate.

La terminarea lucrului se verifică gazul.

Manipularea aparatelor de laborator cu acţionare electrică. Aparatele cu acţionare electrică se vor monta şi exploata în aşa mod încât să fie prevenite electrocutările, arsurile, incendiile şi exploziile.

Aparatele de încălzit electrice (cuptoare, etuve, băi electrice) trebuie aşezate pe mese protejate cu tablă de oţel şi acoperite cu foi de azbest. Ele vor fi conectate la o priză cu legătură la pământ pentru a se evita electrocutările.

Nu se admite legarea mai multor aparate la o singură priză sau legarea la priză a aparatelor lipsite de ştecher standard.

Aparatele la care sunt observate scântei sau care prezintă scurtcircuite nu se vor utiliza decât după remedierea defecţiunii.

Conectarea aparatelor electrice la reţea se va face respectând riguros condiţiile de voltaj indicate pe aparatul respectiv.

Instalaţiile electrice, precum şi aparatele electrice din laborator nu se vor manipula având mâinile umede.

La terminarea lucrărilor nu vor mai rămâne conectate la reţea decât aparatele electrice speciale (termostate, frigidere).

Manipularea substanţelor toxice, caustice şi inflamabile. Majoritatea accidentelor pot surveni la manipularea incorectă a substanţelor chimice (reactivilor) corosive, toxice, inflamabile sau explozibile. Aşa de exemplu, deosebit de corosive sunt soluţiile concentrate de hidroxizi alcalini (NaOH şi KOH), soluţia concentrată de amoniac (NH_4OH), acizii concentraţi (acid sulfuric, clorhidric, azotic, acetic), perhidrolul (H_2O_2), bromul etc.

Când se lucrează cu astfel de substanţe este necesară manipularea lor cu deosebită atenţie, sub nişă, utilizând ochelari şi mănuşi de protecţie.

DILUAREA ACIZILOR CONCENTRAŢI SE FACE TURNÂND ACIDUL ÎN APĂ, operaţia executându-se în vase din sticlă termorezistentă, turnarea acidului realizându-se în fir subţire şi agitând continuu, asigurând în acelaşi timp vasului o răcire bună deoarece diluarea este puternic exotermă.

Soluţia de amoniac, acidul clorhidric şi azotic concentrat se vor turna avându-se în vedere necesitatea unei foarte eficiente ventilaţii a locului de lucru.

Bromul necesită atenţie sporită la manipulare. Experienţele în care se utilizează brom se vor desfăşura numai sub nişă. Ochii şi mâinile se vor proteja de vaporii de brom prin folosirea ochelarilor şi mănuşilor de protecţie. Se va evita cu stricteţe prelingerea bromului pe marginea vasului deoarece arsurile provocate de brom sunt extrem de greu de vindecat.

Unii solvenţi organici sunt narcotici şi au acţiune toxică asupra organismului uman. Între aceştia se numără cloroformul, eterul etilic (acţiune narcotică), benzenul şi derivaţii săi (acţiune cancerigenă), alcoolul metilic şi etilic (acţiune asupra sistemului nervos), hidrocarburile clorurate (acţiune asupra metabolismului) etc.

Majoritatea substanţelor organice sunt foarte uşor inflamabile şi uşor volatile, de aceea manipularea lor necesită o atenţie sporită. Lichidele inflamabile nu se vor păstra în recipiente de sticlă în cantităţi mai mari de 1 litru. Încălzirea lor se face în vase metalice de maximum 5 litri. Dacă din întâmplare se varsă o cantitate de lichid inflamabil, primul lucru care trebuie făcut este să se întrerupă becurile de gaz şi să se întrerupă încălzitoarele electrice, se închid uşile şi se deschid ferestrele. Lichidul vărsat se va strânge cu o cârpă şi va fi colectat într-un balon cu dop.

Dacă s-a aprins un lichid inflamabil, în linişte şi fără panică, se vor stinge becurile de gaz, se acoperă flacăra cu o pătură sau cu nisip; concomitent cu operaţiile de stingere se vor elimina din încăpere toate vasele ce conţin lichide inflamabile. Dacă nu se reuşeşte stingerea focului se vor anunţa pompierii, precizându-li-se ce fel de substanţe au luat foc. Se va proceda de asemenea la întreruperea curentului electric.

Stingătoarele cu spumă chimică, dioxid de carbon sau tetraclorură de carbon se pot folosi pentru stingerea lichidelor inflamabile miscibile cu apa (de exemplu alcoolii).

Dacă s-a produs aprinderea hainelor unei persoane este indicat ca persoana în cauză să nu alerge şi să se facă stingerea focului prin acoperirea cu o pătură.

Distrugerea lichidelor inflamabile nerecuperabile, miscibile cu apa se face prin aruncarea lor la canal şi amestecarea cu o cantitate mare de apă pentru a se asigura o diluare corespunzătoare. Lichidele inflamabile nemiscibile cu apa sau cu substanţe toxice în conţinut se vor colecta şi se vor elimina prin alte metode.

Măsuri de prim ajutor

În caz de accident, persoanele din laborator, în lipsa unui medic trebuie să fie în măsură să acorde primul ajutor celui accidentat.

Astfel, în cazul arsurilor termice, superficiale sau profunde se recomandă pansamente cu alcool 60%. În caz de arsuri produse de substanțe chimice se va spăla plaga cu multă apă, după ce în prealabil se va îndepărta îmbrăcămintea şi se va proceda după cum urmează: la arsurile produse de acizi plaga se va spăla cu o soluţie de bicarbonat de sodiu 2%; la arsurile produse de substanțe alcaline plaga se va spăla cu o soluţie de acid boric sau acetic 2%, plăgile produse de brom se vor spăla cu benzen sau cu soluţie concentrată de tiosulfat de sodiu.

Când substanțele chimice au pătruns în ochi, se va spăla ochiul cu multă apă apoi cu soluţie specială pentru spălături oculare utilizându-se paharul pentru spălături oculare.

În cazul ingestiei de acizi puternici sau baze puternice se vor introduce în stomac substanțe neutralizante: bicarbonat de sodiu sau acid acetic.

Dacă a survenit intoxicaţia, accidentatul va fi scos din încăpere şi va fi culcat într-o cameră aerisită unde i se va înlătura îmbrăcămintea din jurul gâtului şi al toracelui spre a i se uşura respiraţia. Dacă nu mai respiră, i se va face respiraţie artificială gură la gură.

În caz de electrocutare, se va întrerupe cât mai rapid curentul electric şi va fi scos accidentatul din zona respectivă. Dacă este imposibilă întreruperea curentului electric, accidentatul va fi scos din zona cu tensiune electrică cu ajutorul unor obiecte izolatoare. I se va face accidentatului respiraţie artificială şi va fi transportat de urgenţă la spital.

I

LUCRĂRI PRACTICE PENTRU BIOCHIMIA MONOGLUCIDELOR, OLIGOGLUCIDELOR ŞI POLIGLUCIDELOR

I.1. DOZAREA GLUCIDELOR SOLUBILE

În plante, pe lângă principalele poliglucide (amidon şi celuloză) se găsesc cantităţi apreciabile de oligoglucide (zaharoză, maltoză, celobioză, lactoză, rafinoză etc.) şi monoglucide (D-glucoză, D-fructoză, D-manoză, D-galactoză, D-pentoze). Atât oligoglucidele cât şi monoglucidele sunt uşor solubile în apă şi alcooli inferiori.

Puterea reducătoare a grupei carbonilice din molecula monoglucidelor şi oligoglucidelor reducătoare stă la baza metodelor de dozare a acestora în organismele animale şi vegetale.

I.1.1. DOZAREA MONOGLUCIDELOR ŞI OLIGOGLUCIDELOR REDUCĂTOARE ÎN PLANTE

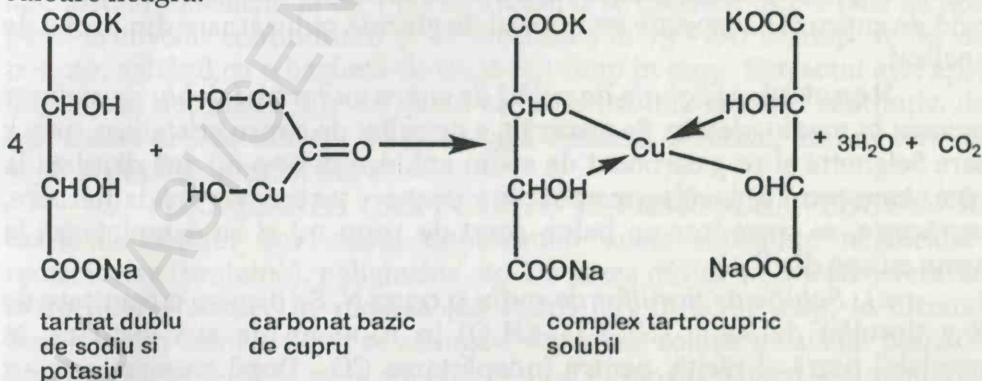
Principiul metodei. Pentru dozarea glucidelor solubile reducătoare se foloseşte un reactiv format din sulfat de cupru şi tartrat dublu de sodiu şi potasiu (*sare Seignette*) în mediu alcalin. Prin amestecarea sulfatului de cupru cu carbonatul de sodiu are loc reacţia:



$$2CuSO_4 + Na_2CO_3 + 2H_2O \longrightarrow CuCO_3.Cu(OH)_2 + 2NaHSO_4$$

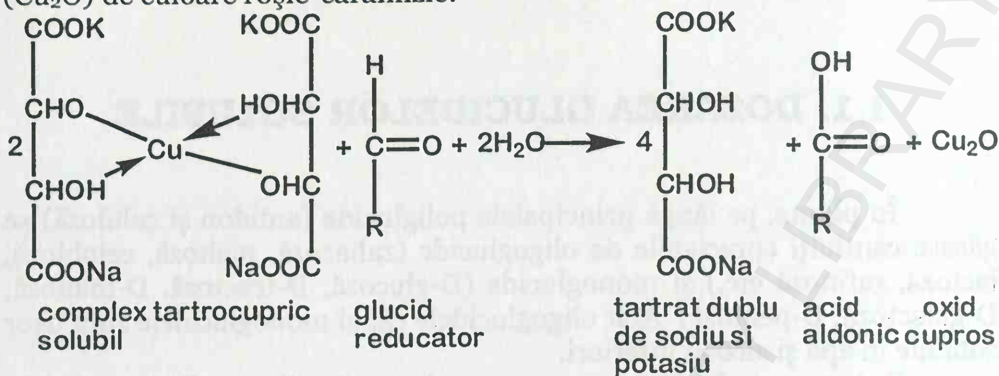
sulfat de cupru | carbonat de sodiu | carbonat bazic de cupru | bisulfat de sodiu

Tartratul dublu de sodiu şi potasiu (sare Seignette) prezent în amestec facilitează formarea complexului tartro-cupric solubil, împiedicându-se astfel formarea oxidului de cupru (CuO) insolubil, de culoare neagră.



Monoglucidele şi oligoglucidele reducătoare (cu legătură monocarbonilică: maltoza, celobioza, lactoza) reduc cuprul din complexul

tartro-cupric solubil, la cald, cu formarea unui precipitat de oxid cupros (Cu_2O) de culoare roşie-cărămizie:



După cantitatea de Cu_2O format (care este direct proporţională cu cantitatea de glucide reducătoare) se poate aprecia conţinutul de glucide în proba de analizat.

Cantitatea de oxid cupros format se determină iodometric. Pentru aceasta oxidul de cupru (I) format se dizolvă într-o soluţie de acid clorhidric (HCl) şi apoi se oxidează cu un exces de soluţie titrată de iod. Prin dizolvarea oxidului de cupru (I) în HCl se obţine un complex incolor ($H[CuCl_2]$), respectiv sarea sa de sodiu dacă se ia în considerare prezenţa în mediul de reacţie a ionilor Na^+.



Complexul astfel obţinut nu este stabil, descompunându-se în prezenţa iodului după ecuaţia:



Iodul care nu a reacţionat este titrat cu tiosulfat de sodiu în prezenţa amidonului ca indicator:



Din volumul de soluţie de iod consumată pentru oxidarea oxidului cupros se poate calcula, ţinând seama de ecuaţiile de mai sus, cantitatea de oxid de cupru (I), respectiv conţinutul de glucide reducătoare din proba de analizat.

Reactivi. *1) Soluţie de sulfat de cupru cu tartrat dublu de sodiu şi potasiu în mediu alcalin.* Se dizolvă 5 g de sulfat de cupru cristalizat, 300 g sare Seignette şi 10 g carbonat de sodiu anhidru în 900 ml apă distilată la rece. Amestecul se încălzeşte apoi timp de 2 ore pe baie de apă la fierbere, se răceşte, se trece într-un balon cotat de 1000 ml şi se completează la semn cu apă distilată.

2) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,0323 N. Se dizolvă o cantitate de 8 g tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) în 1000 ml de apă distilată, în prealabil fiartă şi răcită, pentru îndepărtarea CO_2. După trecerea a 2 - 3 zile, se stabileşte factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu cu ajutorul unei soluţii de dicromat de potasiu N/25. La 1 ml de soluţie de tiosulfat de sodiu EXACT 0,0323 N corespunde 1 mg de glucoză.

3) Soluţie de iod 0,0323 N. Se dizolvă 4,1 g iod metalic şi 20 g iodură de potasiu (KI) în 25 - 50 ml apă distilată. După dizolvarea completă a reactivilor, volumul soluţiei se aduce la 1000 ml cu apă distilată.

4) Soluţie de amidon 1%. Se suspendă 1 g de amidon în 10 ml apă distilată rece, apoi suspensia obţinută se adaugă la 90 ml apă distilată în fierbere. Se fierbe timp de 2 minute, soluţia se răceşte şi se completează volumul la 100 ml cu apă distilată. Pentru conservare, în soluţia de amidon se dizolvă clorură de sodiu (NaCl) până la saturare.

5) Soluţie de HCl 0,8913 N. Se diluează 82 ml de HCl concentrat (d=1,19 g/ml) cu apă distilată până la volumul de 1000 ml.

6) Soluţie de acetat bazic de plumb. 60 g acetat de plumb se mojarează cu 20 g PbO (litargă). Amestecul se încălzeşte într-o capsulă de porţelan acoperită cu o sticlă de ceas pe baia de apă la fierbere până masa capătă o culoare alb-roz. Se adaugă 200 ml de apă distilată fierbinte, trecându-se cantitativ într-un balon cotat de 250 ml. Se lasă să se răcească, se completează la semn cu apă distilată, se lasă în repaus 10 - 12 ore, apoi se filtrează în flacoane brune, închise ermetic, deoarece în contact cu aerul soluţia se tulbură.

7) Soluţie saturată de sulfat de sodiu.

8) Pudră de talc.

Modul de lucru. Dozarea monoglucidelor şi diglucidelor reducătoare (maltoză, celobioză etc.) în plante cuprinde 3 operaţii:

a) extragerea glucidelor din ţesutul vegetal cu ajutorul apei;

b) purificarea extractului obţinut

c) dozarea glucidelor reducătoare în extractul purificat (defecat) obţinut.

A) PREPARAREA EXTRACTULUI VEGETAL. O cantitate de 5 – 25 g (în funcţie de conţinutul presupus de glucide reducătoare) de material vegetal uniform omogenizat prin mojarare sau măcinare se introduce într-un flacon conic de 150 - 200 ml cu ajutorul a 70 - 80 ml de apă distilată încălzită la 85 - 90°C. Flaconul se cufundă într-o baie de apă până la nivelul conţinutului şi se încălzeşte la 75 - 80°C timp de 60 de minute, agitând cu o baghetă de sticlă din timp în timp. Extractul este apoi filtrat prin decantare într-un balon cotat de 100 ml, spălând cantitativ, de mai multe ori, cu câte 5 - 10 ml de apă distilată fierbinte, atât materialul vegetal din flacon cât şi filtrul.

B) PURIFICAREA (DEFECAREA) EXTRACTULUI VEGETAL. În extractul obţinut vor exista întotdeauna unele substanţe neglucidice reducătoare (proteine), poliglucide etc. De aceea devine necesară defecarea extractelor glucidice în vederea purificării lor. În acest scop, la filtratul fierbinte din balonul cotat se adaugă 1 – 5 ml de soluţie de acetat bazic de plumb (reactiv 6) şi se agită energic. Se lasă în repaus pentru sedimentarea precipitatului format. După 10 - 15 minute se controlează dacă defecarea extractului este completă adăugându-se la extractul clar câteva picături de acetat bazic de plumb. Dacă soluţia nu devine opalescentă, defecarea este

completă. În caz contrar se mai adaugă amestecului un volum de soluţie de acetat bazic de plumb. Conţinutul balonului cotat se răceşte şi se completează la semn cu apă distilată. Se lasă apoi pentru sedimentarea cât mai completă a precipitatului după care se filtrează într-un pahar uscat.

Un volum de 50 ml de filtrat se trece într-un balon cotat de 100 ml şi se adaugă 3 - 5 ml de soluţie saturată se sulfat de sodiu (reactiv 7) pentru îndepărtarea excesului de acetat bazic de plumb. Conţinutul balonului se completează la semn cu apă distilată şi se agită. După depunerea precipitatului, soluţia se filtrează din nou pe hârtie de filtru cantitativă (pentru precipitate fine) sau se centrifughează. În filtratul obţinut pe această cale se vor doza glucidele reducătoare.

C) DOZAREA GLUCIDELOR REDUCĂTOARE ÎN EXTRACTUL VEGETAL DEFECAT ŞI PURIFICAT. Într-un flacon conic de 300 ml se măsoară cu o pipetă 1 - 20 ml filtrat defecat şi se completează până la 25 ml cu apă distilată. Se adaugă 50 ml soluţie de complex tartro-cupric (reactiv 1) şi un vârf de spatulă de pulbere de talc sau piatră ponce. Conţinutul flaconului se aduce la fierbere pe o sită de azbest. Apoi se fierbe moderat, la flacără mică, timp de 5 minute. După fierbere, fără agitare, flaconul se răceşte într-o baie de apă.

În flacon se introduc apoi 15 ml soluţie de HCl 0,8913 N (reactiv 5) şi imediat (în caz contrar oxidul cupros care trece în soluţie se poate oxida cu oxigenul din aer) se adaugă din biuretă 20 ml soluţie de iod 0,0323 N (reactiv 3). Conţinutul flaconului se agită cu atenţie, prin rotire şi se lasă în repaus 2 minute. Apoi se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,0323 N (reactiv 2) până la culoarea galben-închis. Se adaugă câteva picături de soluţie de amidon 1% (reactiv 4) şi se continuă titrarea până la dispariţia coloraţiei indicatorului (conţinutul flaconului va avea o tentă bleu-pal). Se va nota numărul de ml de soluţie de tiosulfat de sodiu 0,0323 N consumaţi.

Paralel cu proba de analizat se execută un control în care extractul glucidic este înlocuit cu un volum echivalent de apă distilată.

OBSERVAŢIE. După fierbere soluţia din flacon trebuie să fie colorată în albastru. Dacă culoarea este galbenă înseamnă că extractul vegetal are o concentraţie prea mare de glucide reducătoare. În acest caz se va repeta determinarea diluându-se corespunzător extractul glucidic defecat.

Calculul rezultatelor. Cantitatea glucidelor reducătoare exprimată în grame de glucoză la 100 g de material vegetal proaspăt se calculează după formula:

$$X = \frac{(n_1 - n_2).F.100.100.100}{a.v.50.1000} = \frac{(n_1 - n_2).F.20}{a.v}$$

, în care:

n_1 - ml soluţie de tiosulfat consumaţi la titrarea controlului;

n_2 - ml soluţie de tiosulfat consumaţi la titrarea probei de analizat;

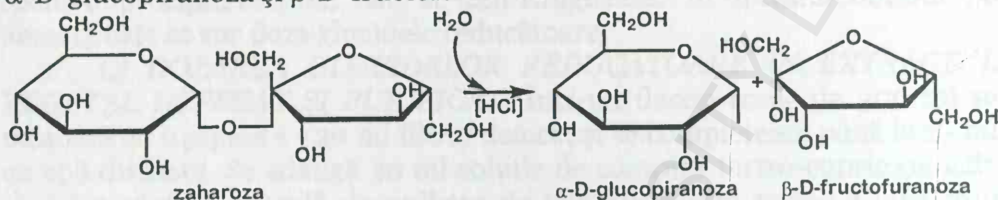
F - factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu aflat prin titrare cu soluţie de dicromat de potasiu N/25;

v - volumul de filtrat luat pentru determinarea glucidelor reducătoare, în ml;

a – greutatea materialului vegetal, în grame.

I.1.2. DOZAREA ZAHAROZEI ÎN PLANTE

Principiul metodei. În toate plantele, dar cu precădere în sfecla de zahăr şi în trestia de zahăr, precum şi în fructe, legume etc., alături de glucidele reducătoare se găseşte o cantitate însemnată de zaharoză, diglucid lipsit de proprietăţi reducătoare. Pentru determinarea acestui diglucid este necesară hidroliza lui prealabilă sub acţiunea HCl în α-D-glucopiranoză şi β-D-fructofuranoză:



Monoglucidele rezultate prin hidroliza zaharozei, de asemenea, monoglucidele şi oligoglucidele reducătoare existente în extractul glucidic (filtratul obţinut după precipitarea excesului de acetat bazic de plumb cu sulfat de sodiu – *etapa c din Lucrarea I.1.1*) se dozează prin metoda de mai sus (*Lucrarea I.1.1*). Astfel aflăm cantitatea de glucide reducătoare totale (monoglucide şi oligoglucide reducătoare şi monoglucide obţinute prin hidroliza zaharozei). Făcând diferenţa dintre cantitatea de glucide reducătoare totale şi conţinutul de monoglucide şi oligoglucide reducătoare aflat prin metoda din *Lucrarea I.1.1*, se obţine concentraţia de zaharoză din materialul vegetal cercetat.

Reactivi. *1) Soluţie de acid clorhidric 5%:* La 95 ml de apă distilată se adaugă 5 ml de soluţie concentrată de acid clorhidric (HCl).

2) Soluţie saturată de carbonat de sodiu.

3) Soluţie de roşu de metil: 0,1 g roşu de metil se dizolvă în 30 ml alcool etilic 96% şi se diluează la 50 ml cu apă distilată.

4) Soluţie de sulfat de cupru cu tartrat dublu de sodiu şi potasiu în mediu alcalin (vezi *Reactivi de la Lucrarea I.1.1*).

5) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,0323 N (vezi *Reactivi de la Lucrarea I.1.1*).

6) Soluţie de iod 0,0323 N (vezi *Reactivi de la Lucrarea I.1.1*).

7) Soluţie de amidon 1% (vezi *Reactivi de la Lucrarea I.1.1*).

8) Soluţie de HCl 0,8913 N (vezi *Reactivi de la Lucrarea I.1.1*).

Modul de lucru. Se măsoară 1 - 5 ml filtrat pregătit pentru analiza glucidelor reducătoare (vezi *Lucrarea I.1.1*), (obţinut după precipitarea excesului de acetat de plumb cu soluţie de sulfat de sodiu în extractul defecat) într-un flacon conic de 100 ml şi se completează cu apă distilată la 25 ml.

În flacon se adaugă 2,5 ml soluţie de HCl 5%. Apoi flaconul se introduce într-o baie de apă la fierbere şi se menţine timp de 30 minute pentru hidroliza zaharozei. După expirarea timpului de hidroliză, flaconul

cu soluţia de cercetat se răceşte pe o baie de apă şi se neutralizează cu soluţie saturată de carbonat de sodiu în prezenţa **unei picături** de roşu de metil. Se adaugă soluţie de carbonat de sodiu până când culoarea indicatorului virează în galben-auriu. După neutralizare în soluţia obţinută se dozează conţinutul glucidelor reducătoare pe aceeaşi cale descrisă la metoda de dozare a mono- şi oligoglucidelor reducătoare (*Lucrarea I.1.1*). Rezultatul reprezentând suma glucidelor reducătoare şi a zaharozei se calculează după formula dată în *Lucrarea I.1.1*. Scăzând din această valoare conţinutul de glucide reducătoare obţinut în *Lucrarea I.1.1*, se află cantitatea de zaharoză în materialul de analizat.

Importanţa practică. Dozarea monoglucidelor şi diglucidelor în ţesuturile vegetale îşi găseşte utilizare în practica de ameliorare şi selecţionare a unor noi soiuri de plante. Investigaţia biochimică poate evidenţia noile însuşiri dobândite de un soi sau altul de plante pe parcursul selecţiei, indicându-l pe cel mai bun pentru cerinţele practicii agricole.

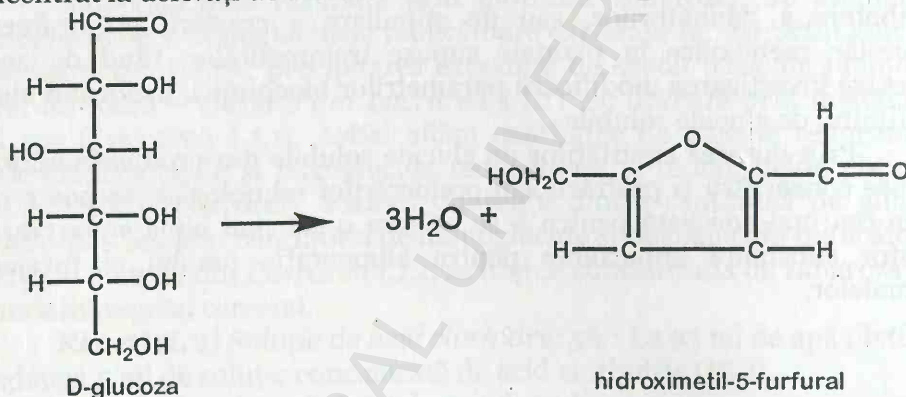
De asemenea, folosirea pe scară largă a diferitelor substanţe de combatere a dăunătorilor, sau de stimulare a creşterii pot influenţa procesele metabolice în plantele supuse tratamentelor, fiind de aceea necesară investigarea modificării parametrilor biochimici, incluzând aici şi conţinutul de glucide solubile.

Prin dozarea cantităţilor de glucide solubile din produsele agricole supuse conservării şi păstrării sau prelucrărilor tehnologice, se poate găsi calea cea mai adecvată pentru a se asigura o cât mai bună conservare a acestor substanţe importante pentru alimentaţia omului şi furajarea animalelor.

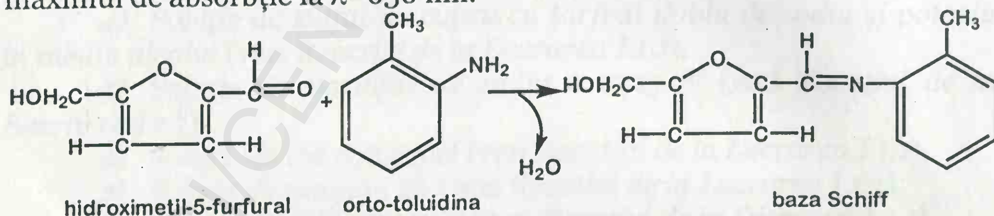
I.1.3. DOZAREA GLUCOZEI ÎN SÂNGE (MICROMETODA COLORIMETRICĂ CU ORTO-TOLUIDINĂ)

În condiţii normale, în sângele omului şi animalelor se găseşte o cantitate relativ constantă de D-glucoză, cunoscută şi sub denumirea de *zahăr sanguin* sau *glicemie*. De fapt, alături de D-glucoză, în sânge se mai găsesc cantităţi neglijabile şi de alte glucide (D-fructoză, glicogen etc.). În unele stări fiziologice şi patologice, pentru aprecierea stării metabolismului glucidic în organismul uman sau animal, este importantă cunoaşterea glicemiei.

Principiul metodei. Glucoza, precum şi alte aldohexoze, prezente în sânge, se dehidratează prin încălzire în prezenţa acidului acetic concentrat la derivaţi de furfural:



Hidroximetil-5-furfuralul format se condensează cu **orto-toluidina(2-aminotoluenul)** dând un compus colorat în verde cu maximul de absorbţie la λ=630 nm:



Reacţia cu orto-toluidina este stabilizată prin adăugarea de tiouree. Deşi reacţia cu orto-toluidina nu este strict specifică pentru glucoză, interferenţa altor aldohexoze este neglijabilă, ele existând doar sub formă de urme în sânge.

Reactivi. *1) orto-Toluidină pură* (**ATENŢIE! TOXIC !**). Substanţa trebuie să fie incoloră sau slab colorată în galben. Se păstrează la frigider, în sticle de culoare închisă (brună), cu închidere etanşă. Orto-toluidina de culoare galbenă sau roşietică se va purifica prin distilare (pe o plită electrică cu sită de azbest sau pe baie electrică cu nisip). Se recomandă

distilarea în vid pentru a nu se depăşi temperatura de descompunere a substanţei (p.f. = 200,2°C la care substanţa se descompune; în vid, la 80 mm Hg, compusul are p.f. = 121°C, temperatură la care este stabil).

2) Acid acetic glacial.

3) Tiouree.

4) Reactiv orto-toluidinic (**ATENŢIE! TOXIC !**). Într-un balon cotat de 50 (100) ml se introduc 0,075 (0,15) g de tiouree. Se adaugă 3 (6) ml de orto-toluidină incoloră sau slab colorată în galben. Se completează volumul soluţiei la 50 (100) ml cu acid acetic glacial. Pentru măsurarea orto-toluidinei, acidului acetic sau a reactivului orto-toluidinic se va utiliza **O PIPETA AUTOMATĂ SAU O PIPETA PREVĂZUTĂ CU PARĂ DE CAUCIUC SAU O BIURETĂ CU ROBINET !**

5) Soluţie de acid tricloracetic 3 %.

6) Soluţie de acid benzoic 0,2 %. Se dizolvă 0,2 g acid benzoic cristalizat în 50 ml apă distilată prin încălzire pe baia de apă. După răcire soluţia se va transvaza cantitativ într-un balon cotat de 100 ml şi se va completa la semn cu apă distilată.

7) Soluţie etalon de glucoză 100 mg %. Se prepară în momentul utilizării. Se dizolvă 100 mg glucoză anhidră în 100 ml soluţie de acid benzoic 0,2 %. Se va conserva în frigider.

Modul de lucru. Într-o eprubetă de centrifugă se vor măsura 0,9 ml acid tricloracetic 3 % (reactiv 5) şi 0,1 ml sânge. Se agită şi se centrifughează 10 minute la 3000 rotaţii/minut. În paralel se va efectua o probă etalon care conţine 0,9 ml acid tricloracetic 3 % (reactiv 5) şi 0,1 ml soluţie etalon de glucoză (reactiv 7) (*dacă sângele are un conţinut prea mare de glucoză se va folosi o soluţie etalon corespunzător mai concentrată: 200 mg % sau 300 mg %*).

Pentru efectuarea reacţiei de culoare se vor folosi eprubete uscate de 16×160 mm, în care se pipetează:

Reactivi	Eprubetele		
	Control	Etalon	Proba de analizat
Supernatant (ml)	-	-	0,5
Soluţie etalon de glucoză (ml)	-	0,5	-
Soluţie de acid tricloracetic 3 % (ml)	0,5	-	-
Reactiv orto-toluidinic (ml)	4,5	4,5	4,5
Fierbere pe baia de apă exact 10 minute			
Răcire cu apă de robinet			
Citire la spectrofotometru la λ=630 nm faţă de control sau apă distilată			

OBSERVAŢII. În scopul economisirii de reactivi se recomandă adăugarea a 2 ml de reactiv orto-toluidinic (reactiv 4) la 0,5 ml supernatant. Această variantă se poate aplica şi în cazul sângelui cu un conţinut ridicat de zahăr, dacă un volum determinat de supernatant (0,1 - 0,2 ml) se diluează cu ser fiziologic la 0,5 ml, volum final care se supune

mai departe operaţiilor descrise. La calculul rezultatelor se va ţine seama de gradul de diluţie.

Dacă extincţia probei de analizat depăşeşte valoarea de 0,8 se va proceda la diluarea corespunzătoare a sângelui (a supernatantului).

Calculul rezultatelor. Cantitatea de glucoză, exprimată în mg la 100 ml de sânge, se poate calcula după formula:

$$X = \frac{E_S}{E_E} \cdot 100$$, unde: E_S - extincţia probei de analizat;

E_E - extincţia etalonului;

100 - concentraţia glucozei în etalon.

Variaţii fiziopatologice. Glicemia omului sănătos variază între 60 - 110 mg glucoză/100 ml sânge.

Determinarea glicemiei are o importanţă deosebită pentru explorarea modificărilor metabolismului glucidelor sub influenţa diferiţilor factori de natură fiziologică sau patologică. Creşterea cantităţii de glucoză în sânge (*hiperglicemia*) este cauzată de emoţii, frig, altitudine, schimbarea climatului, precum şi de alimentaţie. Folosirea unor medicamente cum sunt morfina, atropina, anestezia cu eter şi cloroform induc o uşoară hiperglicemie. Scăderea cantităţii de glucoză din sânge (*hipoglicemia*) este cel mai adesea observată în cazul unui efort muscular prelungit.

În patologie, variaţia cantităţii de glucoză se întâlneşte într-o serie de boli. Hiperglicemia apare în diabetul zaharat, hiperfuncţia medulosuprarenalei sau adenohipofizei, unele tulburări ale sistemului nervos central etc. Hipoglicemia este asociată cu hiperinsulinismul, inaniţia, boala Addison, insuficienţa funcţională a hipofizei, diferite boli ale ficatului etc.

I.1.4. DOZAREA FRUCTOZEI ÎN PLANTE

Fructoza este monoglucidul cu cel mai pronunţat gust dulce, fiind răspândită în fructe, legume şi în mierea de albine.

Principiul metodei. Fructoza se extrage din ţesutul vegetal (materialul de analizat) cu apă sau cu alcool. În extractul obţinut se precipită proteinele. Prin încălzirea soluţiei defecate cu HCl sau H_2SO_4 are loc transformarea fructozei în hidroximetilfurfurol care reacţionează cu **rezorcina** (resorcinol, m-dihidroxibenzen, 1,3-benzdiol) rezultând o combinaţie organică colorată în vişiniu-roşu. Intensitatea culorii obţinute este direct proporţională cu cantitatea de fructoză din soluţie. Cantitatea de fructoză se calculează măsurând intensitatea culorii produsului de condensare a hidroximetilfurfurolului cu rezorcina.

Reactivi. *1) Alcool etilic 96 %.*

2) Soluţie de acetat de plumb 10%.

3) Soluţie saturată de sulfat de sodiu.

4) Soluţie de HCl 30 %.

5) Soluţie de rezorcină 0,1 % în alcool etilic 96 %. Se dizolvă 100 mg rezorcină în 100 ml alcool etilic 96%.

6) Soluţie etalon de fructoză cu concentraţia de 10 mg %.

Modul de lucru. O cantitate de 5 - 20 g de fructe sau legume sau alt material vegetal de analizat (funcţie de conţinutul presupus în fructoză) proaspăt se omogenizează fin prin mojarare şi se introduce cu ajutorul a 100 ml apă distilată într-un flacon conic de 200 ml. Fructoza se poate doza şi în materialul vegetal fixat cu alcool etilic 96% fierbinte. Flaconul cu materialul vegetal pentru extracţia fructozei şi a altor glucide se suspendă într-o baie de apă şi se menţine la 80 - 90°C timp de 60 minute, agitând periodic cu o baghetă de sticlă. După terminarea extracţiei, flaconul se răceşte şi conţinutul lui se transvazează cantitativ într-un balon cotat de 200 ml cu gâtul larg. Se adaugă în el 5 - 6 ml soluţie de acetat de plumb pentru precipitarea substanţelor care ar putea influenţa determinarea. Conţinutul flaconului se amestecă şi se aduce la semn cu apă distilată. Apoi, conţinutul flaconului se filtrează într-un flacon conic uscat. Într-un balon cotat de 100 ml se măsoară 50 ml de filtrat şi se adaugă 5 ml soluţie saturată de sulfat de sodiu pentru îndepărtarea excesului de acetat de plumb. Lichidele din balon se amestecă şi se completează la semn cu apă distilată. După sedimentare se filtrează prin filtru de hârtie pentru precipitate fine. De notat că la analiza fructelor slab colorate şi cu un conţinut redus de proteine nu se mai face precipitarea acestora cu acetat de plumb.

Cu ajutorul unei pipete gradate de 5 ml se pun într-o eprubetă 2 ml filtrat (ce conţin circa 0,01 - 0,5 mg fructoză) şi se adaugă 2 ml soluţie alcoolică de rezorcină 0,1 % şi 6 ml soluţie de HCl 30 %.

Paralel cu proba, se efectuează un control constând din 2 ml apă distilată, 2 ml soluţie de rezorcină 0,1 % şi 6 ml HCl 30 %. Conţinutul eprubetelor se agită şi ele se introduc într-o baie de apă la 80°C timp de 20 minute. În acest timp are loc reacţia de formare a compusului colorat. După perioada de încălzire, conţinutul eprubetelor se răceşte şi se face citirea extincţiei la lungimea de undă λ=540 nm faţă de control.

OBSERVAŢIE. La dozarea fructozei trebuie să se ţină seama de faptul că, practic, toate ţesuturile vegetale conţin şi zaharoză. Acest diglucid se extrage din ţesutul vegetal împreună cu fructoza, iar prin menţinerea probei în mediu acid, la 80°C se produce hidroliza zaharozei în cantităţi egale de fructoză şi glucoză. De aceea intensitatea coloraţiei care se va dezvolta depinde nu numai de concentraţia fructozei libere în soluţie, ci şi de cantitatea de fructoză eliberată prin hidroliza zaharozei. Prin urmare, în toate cazurile, în acelaşi extract se va doza şi zaharoza şi jumătate din cantitatea obţinută (care corespunde fructozei din molecula zaharozei) se va scădea din valoarea obţinută pentru fructoză prin reacţia cu rezorcina.

Calculul rezultatelor. Se face pe baza unei curbe de etalonare construită cu concentraţii cunoscute, crescânde de fructoză, obţinute dintr-o soluţie de fructoză cu concentraţia de 10 mg %, după cum urmează:

Reactivi	Etaloane						
	C	1	2	3	4	5	6
Cantitatea de fructoză (mg)	0,00	0,025	0,05	0,075	0,10	0,15	0,20
Soluţie de fructoză 10 mg % (ml)	0,00	0,25	0,40	0,75	1,00	1,50	2,00
Apă distilată (ml)	2,00	1,75	1,60	1,25	1,00	0,50	0,00
Soluţie alcoolică de rezorcină (ml)	2	2	2	2	2	2	2
Soluţie de HCl 30 % (ml)	6	6	6	6	6	6	6
Menţinere pe baia de apă la 80°C, timp de 20 minute							
Citire la spectrofotometru la λ=540 nm							

La calcularea cantităţii de fructoză este necesar să se scadă din valoarea obţinută jumătate din conţinutul de zaharoză prezentă în materialul vegetal analizat.

I.1.5. DOZAREA HEXOZAMINELOR ÎN SERUL SANGUIN

Principiul metodei. Hexozaminele, respectiv D-glucozamina şi D-galactozamina, în mediu alcalin reacţionează cu acetilacetona, dând un derivat pirolic, care, în prezenţa **p-dimetilamino-benzaldehidei**, în mediu acid, formează un compus de culoare roz, ce se poate determina spectrofotometric la 530 nm.

Reactivi. *1) Alcool etilic 95%.*

2) Soluţie de acid clorhidric 3N. Se diluează 27 ml de acid clorhidric concentrat (d=1,19 g/cm³) la 100 ml cu apă distilată.

3) Soluţie de hidroxid de sodiu 3N. Se dizolvă 12 g de NaOH în 100 ml de apă distilată la balon cotat.

4) Soluţie de carbonat de sodiu 0,5N. Se dizolvă 35,77 g de carbonat de sodiu cristalizat ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$) în apă distilată într-un balon cotat de 250 ml.

5) Soluţie de acetilacetonă. Se diluează 2 ml acetilacetonă cu soluţie de carbonat de sodiu 0,5 N până la 100 ml. *Soluţia de acetilacetonă se prepară extemporaneu.*

6) Reactiv cromogen. Se dizolvă 0,8 g de p-dimetilamino-benzaldehidă în 30 ml metanol. La soluţia obţinută se adaugă 30 ml acid clorhidric concentrat.

7) Soluţie etalon de glucozamină 5 mg%.

8) Soluţie de roşu de metil 0,1% în alcool etilic 60% (vezi Reactiv 3, *Lucrarea I.1.2*).

Modul de lucru. Într-o eprubetă de centrifugă se introduc 0,1 ml ser proaspăt separat şi 5 ml alcool etilic 95 %. Se agită şi se lasă în repaus 5 - 10 minute, apoi se centrifughează la 3000 rotaţii/minut, timp de 10 minute. După îndepărtarea supernatantului prin decantare, se adaugă peste precipitat 4 ml alcool etilic 95% desprinzând precipitatul şi agitând uşor cu o baghetă de sticlă. Se scoate bagheta spălând-o cu alcool etilic, se centrifughează din nou şi se îndepărtează supernatantul cu atenţie, fără a se antrena precipitatul.

Peste precipitat se adaugă 1 ml soluţie de acid clorhidric 3N, se desprinde precipitatul, în acelaşi mod, folosind pentru aceasta încă 1 ml soluţie de acid clorhidric 3N. Se agită pentru omogenizare după care se ţine la baia de apă la fierbere timp de 4 ore. Pentru a se împiedica evaporarea amestecului în timpul hidrolizei se pune o pâlnie în gura eprubetei. După răcirea eprubetei la curent de apă, conţinutul este filtrat printr-o hârtie de filtru fără cenuşă, într-o eprubetă gradată. Se neutralizează cu soluţie de NaOH 3N în prezenţa unei picături de soluţie de roşu de metil după care se completează cu apă distilată la 10 ml.

Reacția de culoare se face în modul următor:

	Probă	Etalon	Control
Filtrat (ml)	1	-	-
Soluție etalon de glucozamină (ml)	-	1	-
Apă distilată (ml)	-	-	1
Soluție de acetilacetonă (ml)	1	1	1

Se agită și eprubetele sunt ținute în baie de apă la fierbere timp de 20 minute, după care se răcesc la un curent de apă rece.

Se adaugă apoi:

Alcool etilic 95% (ml)	5	5	5
Reactiv cromogen (ml)	1	1	1

Se agită din nou și se lasă în repaus 45 minute, după care se citesc extincțiile probei (E_p) și etalonului (E_{et}) la 530 nm, față de control.

Calculul rezultatelor. Cantitatea de hexozamine în 100 ml ser sanguin se calculează cu ajutorul formulei:

$$mg \text{ hexozamina } \% = \frac{E_p}{E_{et}} \cdot 50$$

Valori de referință: 80 - 124 mg/ml ser sanguin.

I.1.6. DOZAREA ACIDULUI SIALIC ÎN SERUL SANGUIN

Principiul metodei. Acizii sialici (acidul N-acetilneuraminic şi acidul N-glicolilneuraminic) liberi sau conjugaţi reacţionează cu **difenilamina** [$(C_6H_5)_2NH$] în mediu acid, conducând la formarea unui complex colorat stabil, cu maximul de absorbţie la 530 nm.

Reactivi. *1) Soluţie de acid tricloracetic 5%.*

2) Amestec de acid acetic / acid sulfuric 9/1 (v/v).

3) Reactiv cromogen. 1 g difenilamină recristalizată se dizolvă în 100 ml amestec de acid acetic/acid sulfuric (9/1). Se păstrează la 4°C şi la întuneric.

Modul de lucru. Dozarea acidului sialic în serul sanguin cuprinde două etape distincte.

A) DEPROTEINIZAREA. La 4,8 ml soluţie de acid tricloracetic 5% se adaugă 0,2 ml ser. Se agită şi se ţine pe baie de apă la fierbere timp de 15 minute. Se răceşte la curent continuu de apă, după care se centrifughează timp de 10 minute la 2500 rotaţii/minut.

B) REACŢIA DE CULOARE. Se vor pipeta următoarele soluţii în două eprubete separate.

	Probă	Control
Supernatant (ml)	2	-
Soluţie de acid tricloracetic (ml)	-	2
Reactiv cromogen (ml)	4	4

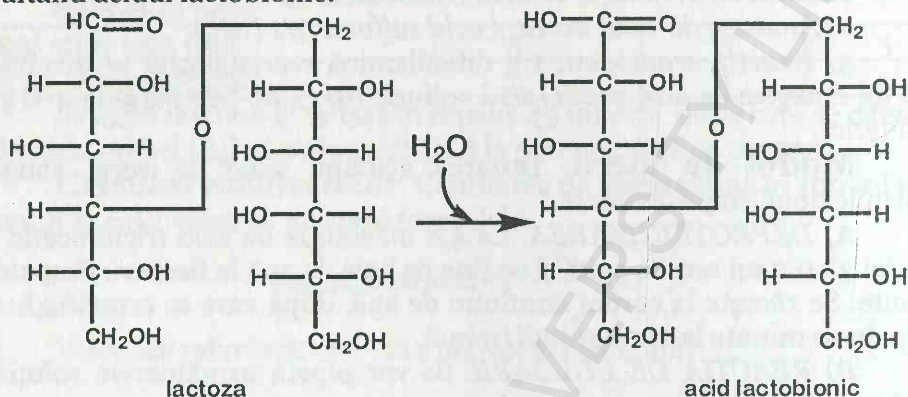
Conţinutul eprubetelor se fierbe pe baia de apă timp de 30 minute, după care se răceşte. Se citeşte extincţia probei faţă de control la un spectrofotometru la lungimea de undă de 530 nm. Rezultatul se va exprima în unităţi de extincţie.

Ca valoare de referinţă se consideră: 0,374 ± 0,041 în unităţi de extincţie.

I.1.7. DOZAREA LACTOZEI ÎN LAPTE

Lactoza (O-β-D-galactopiranozil-(1→4)-α-D-glucopiranoza) este un diglucid reducător care se găseşte preponderent în laptele mamiferelor.

Principiul metodei. Prin interacţia lactozei cu iodul în mediu alcalin are loc oxidarea grupei aldehidice din molecula diglucidului, rezultând acidul lactobionic:



Excesul de iod, care nu a intrat în reacţie cu lactoza, se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu, folosindu-se amidonul ca indicator.

Reactivi. *1) Soluţie de sulfat de cupru 7 %.*

2) Soluţie de hidroxid de sodiu 2 %.

3) Soluţie de fluorură de sodiu 5 % **(ATENŢIE ! REACTIV TOXIC !)**

4) Soluţie de iod 0,1N. Într-un balon cotat de 1000 ml se dizolvă 12,692 g de iod într-o soluţie conţinând 25 g iodură de potasiu în 25 – 35 ml apă distilată. După dizolvarea completă a iodului se completează volumul balonului cu apă distilată la semn.

5) Soluţie de acid clorhidric 5 %.

6) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1N. Se dizolvă o cantitate de 25 de g tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) în 1000 ml de apă distilată, în prealabil fiartă şi răcită, pentru îndepărtarea CO_2. După trecerea a 2 - 3 zile, se stabileşte factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu cu ajutorul unei soluţii de dicromat de potasiu 0,1 N. La 1 ml de soluţie de tiosulfat de sodiu EXACT 0,1 N corespund 18,01 mg de lactoză.

7) Soluţie de amidon 1% (vezi Reactiv 3, *Lucrarea I.1.1*)

Modul de lucru. În două baloane cotate de 50 ml se măsoară câte 5 ml soluţie de sulfat de cupru 7% (reactiv 1), 2 ml soluţie de hidroxid de sodiu 2 % (reactiv 2) şi câte 2,5 ml soluţie de fluorură de sodiu 5 % (reactiv 3).

În unul din baloane (proba) se adaugă 5 g de lapte (sau se vor adăuga cu pipeta 5 ml lapte şi se va calcula greutatea pe baza densităţii laptelui), iar în al doilea balon (control) se vor adăuga 5 ml apă distilată.

Conţinutul baloanelor se agită şi se completează la semn cu apă distilată. După 30 minute se va filtra conţinutul baloanelor prin filtru cutat.

În flacoane conice de 200 - 250 ml se pipetează 20 ml filtrat, corespunzător pentru proba de analizat şi pentru control şi se adaugă din biuretă câte 20 ml soluţie de iod 0,1N (reactiv 4) şi sub agitare continuă 10 ml soluţie de hidroxid de sodiu 2 % (reactiv 2). Se închid flacoanele cu dopuri de cauciuc şi se lasă la întuneric, la temperatura camerei. După 20 minute, în fiecare flacon se introduc 10 ml soluţie de HCl 5 %. Excesul de iod nereacţionat se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1N (reactiv 6) până la obţinerea unei culori galben-pai a lichidului din flacoane. Se adaugă apoi 2 - 3 picături de soluţie de amidon 1 % (reactiv 7) şi se continuă titrarea până la dispariţia culorii albastre dată de complexul de adsorbţie al iodului cu amidonul.

Calculul rezultatelor. Cantitatea de lactoză în mg/ml se va calcula după formula:

$$C = (n_1 - n_2) \cdot F \cdot 18{,}01 \cdot \frac{50}{20 \cdot 5} \text{ mg/ml}, \text{ unde:}$$

n_1 - mililitri de soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N consumaţi la titrarea controlului;

n_2 - ml de soluţie de tiosulfat de sodiu consumaţi la titrarea probei;

F - factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu 0,1 N;

18,01 – cantitatea în mg de lactoză corespunzătoare unui ml de soluţie de tiosulfat de sodiu exact 0,1 N.

I. 1. 8. DETERMINAREA GLUCIDELOR SOLUBILE PRIN CROMATOGRAFIE ÎN STRAT SUBŢIRE

Cromatografia este o metodă analitică de separare a mai multor componente chimice dintr-un amestec. Ea are ca principiu separarea componentelor dintr-un amestec pe baza capacităţii de repartiţie între o fază staţionară şi una mobilă. În cazul cromatografiei în strat subţire, rolul de faza staţionară este îndeplinit de apa menţinută pe placa cromatografică. Faza mobilă este reprezentată de un solvent neapos care se deplasează de-a lungul plăcii cromatografice. În decursul acestei deplasări are loc o continuă redistribuire a substanţelor din amestec între cele două faze, mobilă şi staţionară. Viteza de deplasare a substanţelor pe care vrem să le separăm nu este egală cu cea a solventului, ci este direct proporţională cu gradul de solubilitate a fiecărei substanţe în solventul folosit. Cu cât o substanţă petrece mai mult timp în faza mobilă cu atât se va deplasa mai mult cu această fază. Viteza de deplasare a substanţei în raport cu faza mobilă (solventul) se caracterizează prin valoarea R_f, care este raportul dintre distanţa **d** parcursă de substanţa respectivă faţă de linia de start şi distanţa **D** parcursă de frontul solventului faţă de linia de start:

$$R_f = \frac{\mathbf{d}\ \text{(distanţa parcursă de substanta X)}}{\mathbf{D}\ \text{(distanţa parcursă de frontul solventului}}$$

În condiţii experimentale standardizate, valoarea R_f este o constantă caracteristică pentru o substanţă dată. În general substanţele dintr-un amestec se distribuie în mod diferit între cele două faze, deci vor avea R_f – uri deosebite şi de aceea se pot separa.

Separarea şi identificarea glucidelor solubile cu ajutorul cromatografiei în strat subţire se poate realiza utilizând ca suport silicagelul sau oxidul de aluminiu. Suportul poate fi fixat pe o placă de sticlă, de plastic sau o folie de aluminiu.

Principiul metodei. Soluţia de cercetat şi soluţia standard de glucide se aplică pe placa cromatografică. După uscare, placa cromatografică este introdusă în faza mobilă cu baza în apropierea căreia s-au aplicat probele. Solventul care se deplasează în faza staţionară, datorită forţelor capilare, antrenează glucidele care se vor separa în zone distincte. La terminarea separării placa cromatografică este scoasă afară şi uscată, apoi se tratează cu reactivi specifici care vor evidenţia spoturile de glucide. Pentru dozarea glucidelor din spoturi, se detaşează stratul de suport de pe placă şi se supune „incinerării umede" cu un amestec de dicromat de potasiu şi acid sulfuric. Prin titrarea dicromatului de potasiu rămas nereacţionat se află cantitatea de glucide cu care a reacţionat.

Reactivi şi materiale. *1) Cameră cromatografică.*

2) Placă de sticlă pentru cromatografie în strat subţire (13×18 cm).

3) Soluţie de acid boric 0,1 N. Se dizolvă 6,184 g de acid boric (H_3BO_3) în 1000 ml apă distilată la balon cotat.

4) Soluţie de dicromat de potasiu 0,01 N în acid sulfuric 70 %. O cantitate de 2,4603 g de dicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$) se dizolvă în 500 ml acid sulfuric 70% la balon cotat.

5) Soluţie de iodură de potasiu 5 %.

6) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,01N. Se diluează 50 ml soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N (vezi Reactiv 6, *Lucrarea I.1.7*) la 500 ml cu apă distilată într-un balon cotat de 500 ml.

7) Soluţie de glucoză 2 %.

8) Reactiv naftorezorcinic. Se va prepara în momentul utilizării prin amestecarea unui volum de soluţie de **naftorezorcină** (naphtoresorcinol, 1,3-dihidroxinaftalen) 0,2 % în etanol cu un volum egal de soluţie de acid tricloracetic 20 %.

9) Soluţie standard de glucide (glucoză, galactoză, fructoză, manoză, lactoză, zaharoză) 20 mg %.

10) Alcool n-butilic.

11) Acid acetic.

12) Silicagel „G", „KSK".

13) Ghips medical.

Modul de lucru. Plăcile pentru cromatografia în strat subţire se obţin repede prin aplicarea pe suprafaţa lor a unui amestec, cu grosimea de 0,1 - 0,2 mm, alcătuit din 6,11 g silicagel, 0,32 g ghips medical şi 18 ml soluţie de acid boric 0,1 N. Acest amestec este necesar pentru prepararea unei plăci de 13×18 cm.

Plăcile cu suportul aplicat se usucă în aer, apoi se încălzesc 30 minute într-o etuvă pentru activare (temperatura să nu depăşească 100°C). Până la utilizare, plăcile cromatografice se păstrează în exsicator pentru a nu absorbi umiditatea atmosferică. Pot fi utilizate cu rezultate ce au o reproductibilitate remarcabilă plăcile gata preparate, disponibile în comerţ (Merck, Sigma, Fluka etc.)

La distanţa de 2 cm de la marginea inferioară a plăcii se marchează cu creionul punctele de start. Cu ajutorul unor micropipete se vor aplica în punctele marcate volume egale din soluţia de analizat şi soluţia standard de glucide, încât zonele rezultate (spoturile) să aibă acelaşi diametru. Volumul extractului glucidic şi cel al soluţiei standard de glucide depind de concentraţia glucidelor ce trebuie să fie cuprinsă între 5 şi 25 de micrograme în fiecare spot. După uscarea spoturilor, placa se introduce într-o cameră cromatografică pe fundul căreia se află un amestec de developare cu compoziţia n-butanol/acetonă/apă în raportul 4/5/1. Marginea de start a plăcii cromatografice se introduce 0,5 - 1 cm în faza mobilă şi se acoperă camera. Când frontul solventului a migrat până la circa 1 cm faţă de marginea superioară a plăcii (cea opusă liniei de start), placa se va scoate din camera cromatografică, se usucă şi apoi se pulverizează cu reactivul naftorezorcinic. Placa tratată cu reactivul naftorezorcinic pentru detecţia glucidelor se introduce timp de 5 - 10

minute la 90 - 105°C într-o etuvă. După culoarea spoturilor separate se determină compoziţia amestecului de glucide cromatografiat: glucoza şi galactoza se colorează în albastru-violet; fructoza în roşu-maroniu; zaharoza şi maltoza în roşu; lactoza în roşu-violet; ramnoza în verde; xiloza în gri deschis; manoza în albastru deschis şi acizii uronici în albastru. Identificarea glucidelor separate se poate face după R_f.

Amestecul de solvenţi n-butanol/acetonă/apă (4/5/1) este eficient în separarea glucozei, fructozei şi zaharozei. O separare mai bună a soluţiilor complexe de glucide se poate realiza numai prin metoda cromatografiei bidimensionale utilizând amestecul de solvenţi de mai sus pentru prima migrare şi amestecul de metiletilcetonă/acid acetic/metanol (3/3/1) pentru migrarea în cea de-a doua direcţie.

În cazul utilizării plăcilor cromatografice Silufol UV spoturile glucidelor se detectează prin expunere la o lampă UV.

Pentru determinarea cantitativă a glucidelor, suportul cu spoturile conţinând glucide se detaşează de pe placă şi se tratează cu un volum determinat de soluţie de dicromat de potasiu 0,01 N în acid sulfuric 70 % (reactiv 4), încălzind timp de 60 minute pe o baie de apă la 90°C. Sistemul de reacţie se răceşte şi în el se adaugă apoi 20 ml de apă distilată şi 5 ml soluţie de iodură de potasiu 5 % (reactiv 5). Iodul eliberat se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,01 N (reactiv 6) în prezenţa amidonului ca indicator. Paralel cu proba de analizat se realizează un control cu un fragment curat de suport de aceeaşi mărime şi de la aceeaşi înălţime de unde s-a prelevat fragmentul conţinând glucidul. Titrul soluţiei de dicromat de potasiu se stabileşte utilizându-se o soluţie de glucoză 2 % (reactiv 7).

I.2. DOZAREA UNOR POLIGLUCIDE

I.2.1. DOZAREA AMIDONULUI ÎN PLANTE

Amidonul, polimer al α-D-glucopiranozei, este principalul poliglucid de rezervă în majoritatea plantelor. Sintetizat în frunzele verzi pe calea fotosintezei, amidonul se acumulează preponderent în seminţele şi tuberculii multor specii de plante.

Se cunosc diferite metode pentru determinarea cantitativă a amidonului, fiecare dintre ele cu avantajele şi dezavantajele ei. Una dintre metodele rapide şi economice, folosite pentru determinările în serie, este metoda polarimetrică.

Principiul metodei. Amidonul din materialul vegetal se dizolvă în acid clorhidric diluat şi se citeşte deviaţia polarimetrică a soluţiei obţinute.

Reactivi. *1) Soluţie de acid clorhidric 1%.*

2) Soluţie de acid clorhidric 5 %.

3) Soluţie de fosfowolframat de sodiu 10 %. Se dizolvă 3,75 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) şi 6,25 g wolframat de sodiu cristalizat ($Na_2WO_4 \cdot H_2O$) în apă distilată într-un balon cotat de 100 ml. După dizolvarea celor două substanţe se completează la semn cu apă distilată.

4) Soluţie de fosfowolframat de sodiu 4 %. Se va prepara prin diluarea a 4 ml de soluţie de fosfowolframat de sodiu 10 % (reactiv 3) cu 6 ml apă distilată.

Modul de lucru. *A) ANALIZA SEMINŢELOR DE CEREALE.* O cantitate de 5 g seminţe de cereale fin măcinate se introduce într-un balon cotat de 100 ml şi se amestecă bine cu 25 ml acid clorhidric 1% (reactiv 1) până nu se mai observă cocoloaşe. Se mai adaugă 25 ml soluţie de acid clorhidric 1%, pentru spălarea gâtului şi pereţilor balonului. Balonul se introduce într-o baie de apă la fierbere unde se ţine 15 minute, având grijă ca în primele 5 minute de fierbere să agităm balonul continuu, fără a-l scoate din baie. După fierbere se scoate balonul din baie, se toarnă în el imediat 30 ml apă distilată şi se răceşte conţinutul lui până la temperatura de 20°C prin cufundare şi agitare într-un cristalizor cu apă rece. Se adaugă apoi 5 ml soluţie de fosfowolframat de sodiu 10 % (reactiv 3) pentru precipitarea proteinelor. Conţinutul balonului se completează la semn cu apă distilată, se agită pentru amestecare şi se filtrează printr-un filtru uscat într-un flacon uscat, aruncând primii circa 10 ml de filtrat. Filtratul limpede se analizează la polarimetru, cu condiţia ca temperatura soluţiei să fie de 20°C.

B) ANALIZA CARTOFULUI PROASPĂT. O cantitate de 25 g de cartofi proaspeţi se triturează cu 5 ml de acid clorhidric 5 % (reactiv 2) într-un mojar până la obţinerea unei mase omogene. Aceasta se trece într-un flacon conic de 150 ml cu ajutorul a 25 ml soluţie de HCl 1% (reactiv 1). Flaconul se introduce într-o baie de apă la fierbere pentru 15 minute. Apoi conţinutul flaconului se filtrează într-un balon cotat de 100 ml şi se adaugă 35 - 40 ml apă distilată. După răcirea balonului la temperatura de 20°C se adaugă în el 2 ml soluţie de fosfowolframat de sodiu 4 % (reactiv 4), se completează la semn cu apă distilată, se agită şi se filtrează într-un balon cotat. Filtratul limpede se cercetează la polarimetru în aceleaşi condiţii ca şi în cazul precedentei analize.

Calculul rezultatelor. Cantitatea de amidon brut conţinută în produsul cântărit, exprimată în grame la 100 de grame material vegetal, este dată de formula:

$$C = \frac{100 \cdot \alpha_p}{L \cdot \alpha_D^{20}} \text{ grame, în care:}$$

α_p - gradele polarimetrice citite, corespunzătoare probei;

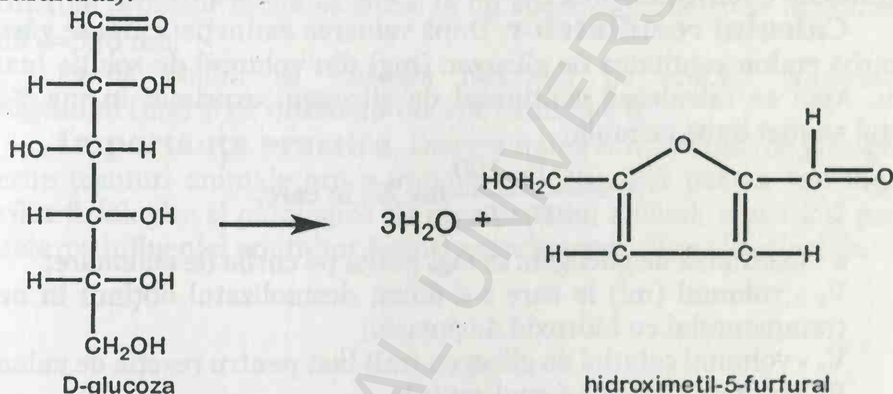
α_D^{20} - deviaţia polarimetrică specifică a amidonului care în cazul soluţiilor obţinute în modul de mai sus are pentru diferite plante următoarele valori: grâu - 182,7; secară - 184,0; orz - 181,5; porumb - 184,6; mei - 171,4; hrişcă - 179,5; cartof - 195,4; orez - 185,9.

OBSERVAŢIE. Soluţia de fosfowolframat de sodiu se poate înlocui cu soluţii de sulfat de zinc (30 g la 100 ml apă distilată) şi ferocianură de potasiu (15 g la 100 ml apă distilată), adăugând întâi 1 ml din prima soluţie şi apoi 1 ml din cea de-a doua soluţie.

I.2.2. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A GLICOGENULUI ÎN ȚESUTURILE ANIMALE

Glicogenul, polimer al α-D-glucopiranozei, reprezintă forma principală de depozitare a glucidelor în organismul animal. Prezența glicogenului a fost dovedită la toate organismele animale aflate pe diferite trepte de dezvoltare evolutivă. La animalele superioare cel mai bogat organ în glicogen este ficatul. În cantitate mai mică acest poliglucid se găsește și în mușchi, creier etc.

Principiul metodei. Țesutul animal se supune desmolizei la cald, în soluție puternic alcalină. Glicogenul conținut în desmolizat, în prezența acidului sulfuric concentrat, la cald, se scindează în glucoză care se deshidratează cu formarea 5-hidroximetilfurfuralului (hidroximetil-5-furfuralului):



5-Hidroximetilfurfuralul se condensează cu **antrona (9,10-dihidro-9-oxoantracenul)** rezultând un compus colorat în verde-albăstrui, intensitatea colorației fiind direct proporțională cu concentrația de glucoză care s-a obținut în urma hidrolizei glicogenului conținut în țesutul analizat. Condensarea se realizează între grupa aldehidică a 5-hidroximetilfurfurolului și grupa metilenică activă din molecula antronei.

Reactivi. *1) Soluție de hidroxid de potasiu 30 %.*

2) Soluție de acid sulfuric 95 %. La 5 ml apă distilată se adaugă cu **ATENȚIE (!)** 100 ml acid sulfuric concentrat și se răcește.

3) Soluție de antronă 0,2 % în acid sulfuric 95 %. Se dizolvă 0,2 g antronă în 100 ml acid sulfuric 95 %. Reactivul este extrem de instabil și de aceea se va prepara cu cel mult 1 oră înaintea determinării, folosindu-se numai în ziua respectivă.

Modul de lucru. Într-o eprubetă cu dimensiunile de 20×150 mm din sticlă termorezistentă se măsoară 3 ml soluție de hidroxid de potasiu (reactiv 1) și se închide cu un dop de cauciuc. Apoi se cântărește la balanța analitică o cantitate de 0,1 - 0,5 g țesut de analizat (ficat, mușchi, creier etc.), tăiat în bucăți mici și se introduce în soluția de hidroxid de

potasiu din eprubetă. Se scoate dopul şi eprubeta se introduce pentru 20 minute în baia de apă la fierbere. După răcire cu apă de la robinet, conţinutul eprubetei se trece într-un balon cotat de 50 - 100 ml, spălând de mai multe ori cu câte 4 - 5 ml de apă distilată, se completează la semn şi se agită puternic.

Din soluţia de glicogen obţinută astfel se măsoară 0,5 - 2,5 ml într-o eprubetă cu dimensiunile 30×200 mm din sticlă termorezistentă şi se completează volumul la 2,5 ml cu apă distilată dacă este cazul. În acelaşi timp, în altă eprubetă identică se vor măsura 2,5 ml de apă distilată pentru controlul reactivilor. Ambele eprubete se introduc într-o baie de apă cu gheaţă. După răcire, în fiecare eprubetă se măsoară din biuretă, cu grijă, în fir subţire şi sub agitare continuă, 5 ml de soluţie de antronă în acid sulfuric 95 % (reactiv 3). Eprubetele se acoperă cu o pară de sticlă şi se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă în fierbere. Apoi se vor răci pe baie de apă cu gheaţă şi imediat se va citi extincţia la spectrofotometru la lungimea de undă λ=620 nm.

Calculul rezultatelor. După valoarea extincţiei citite se găseşte pe curba etalon cantitatea de glicogen (mg) din volumul de soluţie luat în lucru. Apoi se calculează conţinutul de glicogen, exprimat în mg %, în ţesutul studiat după formula:

$$X = \frac{a \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot P} \text{ mg \%, în care:}$$

a - cantitatea de glicogen, în mg, găsită pe curba de etalonare;
V_1 - volumul (ml) la care s-a diluat desmolizatul obţinut în urma tratamentului cu hidroxid de potasiu;
V_2 - volumul soluţiei de glicogen (ml) luat pentru reacţia de culoare;
P - greutatea ţesutului analizat (g);
100 - coeficient de transformare în procente.

Construirea curbei etalon. Pentru construirea curbei etalon se foloseşte o soluţie de glicogen care se prepară dizolvând exact 40 mg glicogen într-un balon cotat de 500 ml în apă distilată fierbinte. După răcirea soluţiei la temperatura camerei, se completează volumul la semn cu apă distilată şi se agită. Această soluţie conţine 0,08 mg glicogen într-un mililitru. Din soluţia obţinută se prepară o serie de probe pentru trasarea curbei etalon, pipetând în eprubete din sticlă termorezistentă, cu dimensiunile de 30×200 mm, volumele de soluţie conform tabelului de mai jos.

Reactivul	Eprubetele								
	C	1	2	3	4	5	6	7	8
Cantitatea de glicogen (mg)	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,16	0,2
Soluţie standard de glicogen (ml)	0	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	2,00	2,5

Reactivul	Eprubetele								
	C	1	2	3	4	5	6	7	8
Apă distilată (ml)	2,5	2,25	2,00	1,75	1,50	1,75	1,00	0,50	0
Probele sunt răcite pe baia de apă cu gheață									
Soluție de antronă (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Probele se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă la fierbere și apoi sunt răcite în apă de robinet									
După răcirea eprubetelor se citește extincția la λ=620 nm									

Este recomandabil ca adăugarea soluției de antronă 0,2 % în acid sulfuric 95 % să se facă la intervale determinate (de exemplu 2 minute) de la o eprubetă la următoarea din serie. Acest interval de timp se va respecta și la citirea extincțiilor după răcirea probelor la temperatura camerei. Extincțiile probelor răcite se citesc la un spectrofotometru la lungimea de undă λ=620 nm.

Curba etalon se trasează înscriind pe abscisă concentrația glicogenului (mg) și pe ordonată valorile extincției E.

Importanța practică. Determinarea conținutului de glicogen în diferite țesuturi animale are o importanță deosebită pentru investigarea stărilor fiziologice și patologice ale organismului animal, precum și pentru cercetarea influenței anumitor factori asupra metabolismului glucidic.

I.2.3. DOZAREA MUCOPOLIZAHARIDELOR ÎN SERUL SANGUIN

Mucopolizaharidele sunt substanţe larg răspândite în ţesutul conjunctiv unde în stare nativă se găsesc legate covalent cu proteinele formând glicoproteine (complecşi polizaharido-proteici). Această clasă de compuşi controlează metabolismul apei, ionilor, al unor metaboliţi intermediari, contribuie la procesul de osificare etc. Din punct de vedere al structurii chimice sunt substanţe heterogene. Fac parte din această categorie de substanţe: acidul hialuronic, condroitina, acizii condroitin-sulfurici, dermatan-sulfatul, keratan-sulfatul şi heparina.

Principiul metodei. Mucopolizaharidele formează cu difenilamina în mediu acid un compus colorat albastru-violet, intensitatea coloraţiei fiind proporţională cu cantitatea de mucopolizaharide din materialul de analizat.

Reactivi. *1) Reactiv Dische.* La 90 ml acid acetic glacial se adaugă cu grijă 10 ml acid sulfuric concentrat. În amestecul obţinut se dizolvă 1g de difenilamină (**Se va lucra în nişă !**).

2) Mixtură aceto-sulfurică. Se amestecă cu atenţie 90 ml acid acetic concentrat cu 10 ml acid sulfuric concentrat. (**SE VA LUCRA LA NIŞĂ !**).

3) Soluţie de acid tricloracetic 5%.

Modul de lucru. Într-o eprubetă curată şi uscată se pipetează 0,2 ml ser sanguin şi 5 ml soluţie de acid tricloracetic 5%. Conţinutul eprubetei se fierbe 20 minute pe o baie de apă. După răcire amestecul din eprubetă se filtrează. Filtratul se foloseşte mai departe, din el realizându-se o probă şi un martor după cum se indică în tabelul de mai jos.

	Probă	Control
Filtrat (ml)	1,5	1,5
Reactiv Dische (ml)	3	-
Mixtură aceto-sulfurică (ml)	-	3

Conţinutul celor două eprubete se fierbe pe baia de apă timp de 30 minute. După răcire la temperatura camerei, se va citi imediat extincţia probei la spectrofotometru la lungimea de undă de 530 nm, faţă de control.

Calculul rezultatelor şi interpretarea acestora. Rezultatele determinării se exprimă în unităţi de extincţie.

Valorile normale sunt de până la 0,45 unităţi de extincţie.

Valori patologice. Creşteri sunt înregistrate în cazuri de reumatism poliarticular acut, poliartrită cronică evolutivă etc.

I.3. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME PARTICIPANTE ÎN ANABOLISMUL ȘI CATABOLISMUL GLUCIDELOR

I.3.1. ENZIME IMPLICATE ÎN SCINDAREA POLIGLUCIDELOR ȘI OLIGOGLUCIDELOR

I.3.1.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII AMILAZELOR

Amilazele catalizează hidroliza legăturilor α-1,4-glicozidice din α-glucanii de tipul amidonului și glicogenului sau în produșii lor de scindare. După acțiunea acestor enzime asupra substratului se deosebesc trei tipuri de amilaze:

1) **α-Amilaza** (1,4-α-D-glucan-glucanohidrolaza, E.C. 3.2.1.1) hidrolizează legăturile α-1,4-glicozidice din interiorul lanțurilor poliglucidice ale moleculei de amidon sau glicogen, cu formarea de poliglucide cu mase moleculare mai mici, numite dextrine și o cantitate determinată de maltoză. Această enzimă este prezentă în toate organismele vii: animale, plante, ciuperci și bacterii.

2) **β-Amilaza** (1,4-α-D-glucan-maltohidrolaza, E.C. 3.2.1.2) este o exoenzimă întrucât hidrolizează legăturile α-1,4-glicozidice în amidon și poliglucidele asemănătoare eliberând succesiv resturile de β-maltoză de la capătul nereducător al lanțului poliglucidic. Neavând abilitatea de a trece peste legăturile α-1,6-glicozidice existente în glicogen și amilopectină, β-amilaza realizează o hidroliză incompletă a acestor poliglucide ramificate cu formarea de dextrine-limită. A fost evidențiată în unele plante superioare (orz, soia, grâu, porumb, cartofi etc.) și diferite bacterii.

3) **γ-Amilaza** sau **glucoamilaza** (1,4-α-D-glucan-glucohidrolaza, E.C. 3.2.1.3) hidrolizează legăturile α-1,4-glicozidice scindând succesiv resturile de glucoză de la capătul nereducător al moleculei de amidon, glicogen, dextrine etc. Este larg răspândită în țesuturile animale și la microorganisme.

Metodele de determinare a activității amilazelor se bazează fie pe dozarea maltozei și glucozei formate din amidon, fie pe estimarea cantității de amidon rămas nescindat, prin folosirea reacției lui cu iodul.

I.3.1.1.1. Determinarea activităţii α-amilazei în serul sanguin şi urină (micrometoda Metais şi Bieth)

În organismul animal α-amilaza este sintetizată predominant la nivelul pancreasului şi glandelor salivare, de unde trece în sânge şi se elimină pe cale renală. α-amilaza de provenienţă animală este activată de ionii de Cl^-, în concentraţie de 0,01M şi inhibată de ionii citrat şi oxalat.

Determinarea activităţii α-amilazei în ser, urină şi sucul duodenal constituie un important test pentru explorarea fiziopatologică a pancreasului.

Principiul metodei. α-Amilaza hidrolizează în timp de 30 minute la 37°C, amidonul în soluţie tampon de fosfat, cu pH 7,4. La sfârşitul perioadei de incubare amidonul nescindat este dozat spectrofotometric, la lungimea de undă λ=580 nm, după coloraţia violet pe care o dă cu iodul.

Reactivi. *1) Soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,4.* Într-un balon cotat de 250 ml se dizolvă 4,8837 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) şi 0,4130 g de fosfat monopotasic (KH_2PO_4) în 150 ml apă bidistilată. Se corectează pH-ul soluţiei la 7,4 la un pH-metru şi se completează la semn cu apă bidistilată. Se conservă în sticlă brună la +4°C.

2) Soluţie tampon de fosfaţi 30 %. Se prepară prin amestecarea a 30 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15 (reactiv 1) cu 70 ml apă bidistilată.

3) Soluţie stoc de amidon 1% în tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,4. Se măsoară 80 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15, cu pH=7,4 (reactiv 1) într-un flacon conic de 150-200 ml şi se aduce la fierbere. Într-un pahar Berzelius de 50-100 ml se suspendă 1 g de amidon în 10 ml soluţie tampon fosfaţi M/15 (reactiv 1). Suspensia de amidon se trece cantitativ în cei 80 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15 în fierbere. Paharul Berzelius se spală de 2-3 ori cu câte 3-5 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15. Lichidele de spălare se adaugă la soluţia de amidon. Pentru distrugerea microorganismelor, soluţia de amidon se fierbe încă 3-5 minute până devine clară. După răcire soluţia de amidon se transvazează cantitativ într-un balon cotat de 100 ml. Flaconul conic în care s-a preparat soluţia de amidon, se spală de 2-3 ori cu volume mici de soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,4 (reactiv 1) care se adaugă în balonul cotat. Soluţia de amidon preparată astfel este stabilă maximum 10 zile dacă se păstrează la +4°C.

4) Soluţie de iod N/3000. Se va prepara extemporaneu (la momentul utilizării) prin diluarea a 0,33 ml soluţie de iod N/10 (vezi Reactiv 4, *Lucrarea I.1.7)* cu apă distilată într-un balon cotat de 100 ml.

5) Soluţie de acid clorhidric 1N. Se vor dilua 9 ml de acid clorhidric (HCl) concentrat (d=1,19 g/cm³) cu apă distilată la 100 ml, într-un balon cotat.

Modul de lucru. *A) DILUAREA LICHIDELOR BIOLOGICE.* În mod normal determinarea activităţii α-amilazei se face cu:
- ser nediluat;

- urină diluată 1/3 cu ser fiziologic;
- suc duodenal diluat cu ser fiziologic până la o activitate potrivită.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII α-AMILAZEI. În momentul efectuării lucrării se prepară o soluţie de amidon 0,3 % amestecând 3 ml soluţia stoc de amidon (reactiv 3) cu 7 ml soluţie tampon de fosfaţi 30 % (reactiv 2).

Pentru efectuarea determinării activităţii α-amilazei se procedează conform indicaţiilor din tabelul de mai jos.

Reactivi	Eprubetele	
	Probă	Martor
Soluţie de amidon 0,3 % (ml)	0,50	0,50
Eprubetele se introduc pentru 5 minute în termostat, la 37°C		
Lichid biologic de analizat (ml)	0,02	-
Se incubează exact timp de 30 minute la 37°C		
Soluţie de acid clorhidric 1N (ml)	0,10	0,10
Lichid biologic de analizat (ml)	-	0,02
Apă distilată (ml)	2,00	2,00
Soluţie de iod N/3000 (ml)	9,00	9,00
Agitare şi citirea extincţiei martorului (E_1) şi probei (E_2) la λ=580 nm, faţă de soluţia de iod N/3000		

Calculul rezultatelor. Activitatea α-amilazei se exprimă în unităţi Wohlgemuth într-un mililitru (U.W./ml) şi reprezintă numărul de mg de amidon hidrolizat în timp de 30 minute la 37°C de enzima din 1 ml de lichid biologic.

Extincţia E_1 corespunde la 1,5 mg de amidon. Diferenţa E_1-E_2 reprezintă cantitatea de amidon hidrolizat de α-amilaza din 0,02 ml de lichid de cercetat. Cantitatea de amidon hidrolizat, exprimată în mg, sub acţiunea α-amilazei în timp de 30 minute va fi:

$$X = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 1{,}5$$

Pentru a obţine numărul de mg de amidon hidrolizat la 37°C, timp de 30 minute, de către enzima din 1 ml ser sanguin (U.W./ml) se amplifică cu 50, deoarece volumul de lichid biologic utilizat este de 0,02 ml:

$$UW / ml = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 1{,}5 \cdot 50$$

La determinarea activităţii α-amilazei se va ţine cont şi de eventualele diluţii ale lichidului biologic de analizat.

OBSERVAŢII. Dacă extincţia E_2 este mai mică decât jumătatea extincţiei E_1 (E_2=E_1/2) se diluează lichidul biologic cu ser fiziologic până la o activitate corespunzătoare şi se va repeta determinarea.

Pentru determinarea activităţii α-amilazei se recomandă folosirea de lichide biologice proaspete. O uşoară hemoliză a sângelui nu influenţează rezultatele.

Importanţa practică. *Amilazemia* (activitatea amilazei serice) are valorile normale cuprinse între 4,5 şi 10,1 U.W./ml. În practică se admit valori anormale acelea care depăşesc de două ori valorile fiziologice adică 15 U.W./ml, ca şi valorile de trei ori mai mari care sunt net patologice (22 U.W./ml).

Amilazuria (activitatea amilazei din urină) variază foarte puternic în funcţie de volumul urinei din 24 ore: 43,5 ± 16,5 U.W./ml.

Creşterea activităţii α-amilazei se întâlneşte mai ales în bolile pancreasului. În pancreatita acută activitatea α-amilazei serice şi urinare creşte de 10 - 30 ori. *Hiperamilazemia* se instalează imediat după începerea bolii, înregistrează maximul la 12 - 24 ore şi apoi scade revenind la normal în 2 - 6 zile. De obicei *hiperamilazuria* se prelungeşte mai mult decât creşterea activităţii enzimei în serul sanguin.

Pancreatitele cronice, cancerul pancreasului nu duc la o creştere pronunţată a activităţii α-amilazei sanguine şi pentru diagnosticarea lor se utilizează aşa-numitele probe provocate. Activitatea amilazică poate fi mărită într-o serie de maladii care au un tablou clinic asemănător cu pancreatita acută: apendicita acută, peritonita, ulcerul perforat al stomacului, ocluzia intestinală, colecistita acută. În cazul peritonitelor activitatea amilazică se datorează α-amilazei sintetizate de bacterii. Activitatea enzimei în bolile indicate se intensifică de 3 - 5 ori. Deci, hiperamilazemia puternic exprimată permite diferenţierea pancreatitei acute nu numai de bolile cronice ale pancreasului, ci şi de alte afecţiuni.

Aproape totdeauna amilazemia este însoţită de amilazurie, însă determinarea activităţii amilazei urinare este un indicator diagnostic mai puţin exact deoarece eliminarea amilazei în urină poate fi corelată cu funcţia rinichilor. Creşterea activităţii amilazei serice în bolile cronice ale rinichilor şi în uremiile acute se poate explica prin diminuarea sau lipsa eliminării enzimei pe cale renală.

Determinarea activităţii amilazei în sânge şi urină poate oferi unele indicaţii asupra stării funcţionale a aparatului renal. În nefroze, glomerulonefrite etc. activitatea amilazică a sângelui este crescută iar cea a urinei scade sub valoarea normală. Coeficientul amilazemie/amilazurie poate sluji ca un indicator al realizării depline a procesului de filtrare glomerulară.

O altă maladie caracterizată prin ridicarea însemnată a activităţii α-amilazei în sânge este parotidita, dar tabloul clinic clar al acesteia dă posibilitatea diferenţierii hiperamilazemiei. Administrarea unor hormoni (ACTH etc.) intensifică activitatea enzimei de câteva ori.

În afecţiunile ficatului (hepatite, ciroze, intoxicaţii, tumori canceroase şi metastazele lor în ficat) se observă scăderea activităţii amilazice a sângelui. *Hipoamilazemia*, de asemenea, se observă în arsurile întinse ale pielii, diabetul zaharat, dispepsii, caşexii etc.

I.3.1.1.2. Determinarea activității α-amilazei în salivă (micrometoda Metais şi Bieth, adaptată de Vlad Artenie)

Principiul metodei. α-Amilaza hidrolizează în timp de 30 minute la 37°C, amidonul în soluţie tampon de fosfaţi, cu pH 7,0. La sfârşitul perioadei de incubare amidonul nescindat este dozat spectrofotometric, la lungimea de undă λ=580 nm, după coloraţia violet pe care o dă cu iodul.

Reactivi. *1) Soluţie de NaCl (ser fiziologic).* Se dizolvă 0,9 g clorură de sodiu (NaCl) în 100 ml apă bidistilată.

2) Soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,0. Într-un balon cotat de 250 ml se dizolvă 4,8837 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) şi 0,4130 g de fosfat monopotasic(KH_2PO_4) în 150 ml apă bidistilată. Se corectează pH-ul soluţiei la 7,0 cu ajutorul unui pH-metru şi se completează la semn cu apă bidistilată. Se conservă în sticlă brună la +4°C.

3) Soluţie tampon de fosfaţi 30 %. Se prepară prin amestecarea a 30 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15 (reactiv 2) cu 70 ml apă bidistilată.

4) Soluţie stoc de amidon 1% în soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,0. Se măsoară 80 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15, cu pH=7,0 (reactiv 2) într-un flacon conic de 150-200 ml şi se aduce la fierbere. Într-un pahar Berzelius de 50-100 ml se suspendă 1 g de amidon în 10 ml soluţie tampon fosfaţi M/15 (reactiv 2). Suspensia de amidon se trece cantitativ în cei 80 ml soluţie tampon de fosfaţi M/15 în fierbere. Paharul Berzelius se spală de 2-3 ori cu câte 5-10 ml de soluţie tampon de fosfaţi M/15 în care s-a turnat suspensia de amidon. Lichidele de spălare se adaugă la soluţia de amidon. Pentru distrugerea microorganismelor, soluţia de amidon se fierbe încă 3-5 minute până devine clară. După răcire soluţia de amidon se transvazează cantitativ într-un balon cotat de 100 ml. Flaconul conic în care s-a preparat soluţia de amidon, se spală de 2-3 ori cu volume mici de soluţie tampon de fosfaţi M/15 cu pH=7,0 (reactiv 2) care se adaugă în balonul cotat. Soluţia de amidon preparată astfel este stabilă maximum 10 zile dacă se păstrează la +4°C.

5) Soluţie de iod N/3000. Se va prepara extemporaneu (la momentul utilizării) prin diluarea a 0,33 ml soluţie de iod 0,1 N (vezi Reactiv 4, *Lucrarea I.1.7*) cu apă distilată la 100 ml.

6) Soluţie de acid clorhidric 1N. Se diluează 9 ml de acid clorhidric (HCl) concentrat (d=1,19) cu apă distilată la 100 ml, într-un balon cotat.

7) Soluţie de acid clorhidric 0,1 N. Se diluează 10 ml soluţie de acid clorhidric 1N cu apă distilată la 100 ml, într-un balon cotat.

Modul de lucru. În mod normal determinarea activităţii α-amilazei se face în salivă diluată cu ser fiziologic.

A) OBŢINEREA SALIVEI DILUATE. Gura se spăla de 4 – 5 ori cu apa pentru îndepărtarea resturilor alimentare. După 5 – 10 minute saliva se prelevează în eprubete Eppendorf curate şi uscate, conice. Lichidul adunat se centrifughează 15 minute la 3000 - 4000 rot./min. Supernatantul se transvazează în alte eprubete Eppendorf.

Pentru determinarea activității α-amilazei saliva separată prin centrifugare se diluează cu ser fiziologic după schema următoare:

1) Se pipetează 0,1 ml salivă în 14,9 ml ser fiziologic sau 0,05 ml salivă + 7,45 ml ser fiziologic. Se realizează o diluţie de 150 ori. Să denumim acest preparat salivă diluată (I).

2) Se amestecă 0,1 ml salivă diluată (I) cu 2,4 ml ser fiziologic. Gradul de diluţie creşte la 150 + 25 = 175 ori (salivă diluată II). Mai departe se va lucra cu soluţia de saliva diluată II.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂȚII α-AMILAZEI. În momentul efectuării lucrării se prepară o soluţie de amidon 0,3 % amestecând 3 (6) ml soluţie stoc de amidon (reactiv 4) cu 7 (14) ml soluţie tampon de fosfaţi 30 % (reactiv 3), în funcţie de numărul probelor de analizat.

Pentru efectuarea determinării activității α-amilazei se procedează conform indicaţiilor din tabelul următor.

Specificaţie	Eprubetele	
	Proba	Martor
Soluţie de amidon 0,3 % (ml)	0,50	0,50
Eprubetele se introduc pentru 5 minute în termostat, la 37°C		
Salivă diluată (ml)	0,10	-
Se incubează exact timp de 30 minute la 37°C		
Soluţie de acid clorhidric 0,1N (ml)	1,00	1,00
Salivă diluată (ml)	-	0,10
Apă distilată (ml)	1,40	1,40
Soluţie de iod N/3000 (ml)	9,00	9,00
Agitare şi citirea extincţiei martorului (E_1) şi probei (E_2) la λ=580 nm, faţă de soluţia de iod N/3000		

Calculul rezultatelor. Activitatea α-amilazei se exprimă în unități Wohlgemuth într-un mililitru (U.W./ml) şi reprezintă numărul de mg de amidon hidrolizat în timp de 30 minute la 37°C de enzima din 1 ml de salivă.

Extincţia E_1 corespunde la 1,5 mg de amidon. Diferenţa E_1-E_2 reprezintă cantitatea de amidon hidrolizat de α-amilaza din 0,10 ml salivă diluată. Cantitatea de amidon hidrolizat, exprimată în mg, sub acţiunea α-amilazei în timp de 30 minute va fi:

$$X = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 1,5$$

Pentru a obţine numărul de mg de amidon hidrolizat la 37°C, timp de 30 minute, de către enzima din 1 ml salivă (U.W./ml) se utilizează formula următoare:

$$UW/ml = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \times 1,5 \times \frac{2,5}{0,1} \times \frac{15}{0,1} \times \frac{1}{0,1}$$

OBSERVAŢII. 1. Dacă extincţia E_2 este foarte apropiată de extincţia E_1, diferenţa dintre E_1 şi E_2 fiind mai mică de 0,100 unităţi de extincţie, atunci se va lucra cu saliva diluată I. La calculul final se va ţine cont de diluţia făcută.

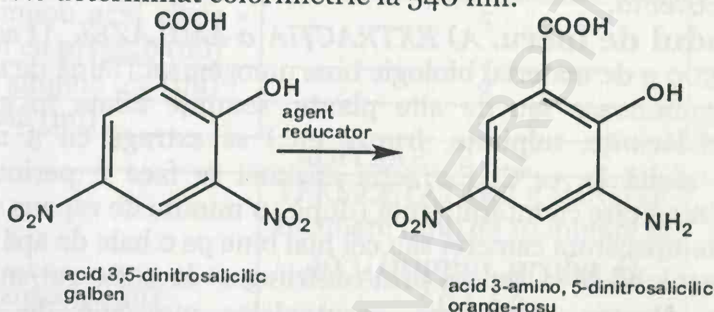
2. Dacă extincţia E_2 este mai mică decât jumătatea extincţiei E_1 ($E_2=E_1/2$) se diluează saliva cu ser fiziologic până la 200 de ori, adăugând 0,1 ml salivă diluată II la 2,4 ml ser fiziologic. Se obţine saliva diluată III. La calculul final se va ţine cont de diluţia făcută.

3. Pentru determinarea activităţii α-amilazei se recomandă folosirea de salivă proaspătă.

I.3.1.1.3. Determinarea activității α-amilazei și β-amilazei în plante (metoda Noelting-Bernfeld, modificată parțial de Vlad Artenie)

În plante se întâlnesc α- şi β-amilaze a căror activitate creşte apreciabil în timpul germinaţiei seminţelor conţinând o mare cantitate de amidon. Creşterea activităţii amilazice în timpul germinaţiei seminţelor de graminee se explică în cazul α-amilazei prin sinteza **de novo** a enzimei, iar pentru β-amilază este specifică activarea zimogenului ei sub influenţa stimulatorilor naturali de creştere din clasa giberelinelor şi auxinelor.

Principiul metodei. α-Amilaza sau β-amilaza hidrolizează amidonul cu formare de maltoză liberă. Aceasta reduce în mediul alcalin acidul 3,5-dinitrosalicilic la acid 3-amino-5-nitrosalicilic de culoare oranj - roşu care este determinat colorimetric la 540 nm:



În paralel cu proba de analizat se efectuează un martor pentru substanţele reducătoare ce le-ar putea conţine eventual extractul sau preparatul amilazic.

Reactivi. *1) Soluţie tampon acid citric-citrat trisodic 0,1M cu pH 5,6.* Într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 2,8789 g acid citric ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) în circa 100 ml apă distilată şi apoi se introduc 12,9649 g citrat trisodic ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5½H_2O$) folosind 200-300 ml apă distilată. Înainte de completarea la semn se verifică pH-ul soluţiei şi dacă este cazul se corectează cu soluţie de NaOH 1N sau cu soluţie de acid citric.

2) Soluţie tampon pentru extracţia β-amilazei. Se prepară prin dizolvarea a 50 mM (6,06 g) **Trizma base** [Tris; Tris(hydroxymethyl)aminomethane: $C_4H_{11}NO_3$ M = 121,1] şi 1 mM (0,37 g) etilendiamnotetraacetat disodic (disodium EDTA) în 500 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 1000 ml. Se corectează pH-ul la 8,0 (în cazul seminţelor de graminee) sau la 6,2 (în cazul altor specii de plante) cu soluţie de HCl 1 N şi se completează volumul balonului la semn cu apă bidistilată. Se păstrează la +4°C.

3) Soluţie de amidon 2%. Suspensia obţinută prin amestecarea a 2 g de amidon cu 20 ml apă distilată se adaugă la 80 ml apă distilată la fierbere şi se continuă încălzirea până la clarificarea soluţiei. Soluţia obţinută se fierbe încă 1 – 2 minute pentru sterilizare, se răceşte şi se completează cu apă bidistilată la 100 ml într-un balon cotat.

4) Soluţie de acid 3,5-dinitrosalicilic 1%. Se amestecă 1 g de acid 3,5-dinitrosalicilic cu 5-10 ml apă distilată. La amestecul obţinut se adaugă lent şi agitându-se continuu 20 ml soluţie de NaOH 2N. După dizolvarea completă a reactivului, la temperatura camerei, volumul soluţiei se aduce la 50 ml cu apă distilată şi se adaugă 30 g de tartrat dublu de sodiu şi potasiu (sare Seignette). Se agită până la dizolvarea tartratului dublu de sodiu şi potasiu, se completează volumul soluţiei la 100 ml cu apă distilată şi se filtrează. Soluţia de acid 3,5-dinitrosalicilic se conservă în flacoane brune, ermetic închise pentru reducerea efectelor CO_2 asupra alcalinităţii ceea ce ar putea vicia rezultatele.

5) Soluţie etalon de maltoză 200 mg%. Într-un balon cotat de 100 ml, se dizolvă 200 mg maltoză în circa 50 ml apă distilată, apoi se completează la semn cu acelaşi solvent.

6) Cisteina.

Modul de lucru. *A) EXTRACŢIA α-AMILAZEI.* O cantitate de 0,100 – 0,500 g de material biologic bine omogenizat (făină de seminţe de cereale, leguminoase sau de alte plante, seminţe aflate în germinaţie, plantule, rădăciniţe, tulpiniţe, frunze etc.) se extrage cu 5 ml de apă bidistilată, răcită la +4°C. Extracţia enzimei se face o perioadă de 60 minute, prin agitare cu intermitenţă (după 10 minute de repaus se agită un minut), la temperatura camerei sau cel mai bine pe o baie de apă cu gheaţă. Reziduul insolubil se va separa prin centrifugare la 4000 rot/min timp de 15 minute. Pentru inactivarea eventualelor molecule de β-amilază, extractul amilazic se va termostata timp de 15 minute la 70°C, în prezenţa ionului de calciu. Înainte de termostatare, la 5 ml extract amilazic se adaugă 40 mg acetat de calciu [$Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$] care are rolul de a proteja activitatea α-amilazei în timpul tratamentului termic. După termostatare, extractul enzimatic se va răci imediat într-o baie cu apă rece de la robinet. Se vor inactiva în acest mod doar moleculele de β-amilază, moleculele de α-amilază rămânând complet active.

B) EXTRACŢIA β-AMILAZEI. Extracţia β-amilazei se poate efectua utilizând în acest scop *soluţia tampon de extracţie* (reactiv 5) cu şi fără adaos de cisteină. Adăugarea cisteinei este necesară pentru a extrage β-amilază *insolubilă* existentă în seminţele negerminate. Enzima extrasă numai cu *soluţia tampon de extracţie* este definită ca **β-amilază solubilă** iar enzima extrasă cu soluţie tampon plus cisteină reprezintă **β-amilaza totală.**

Înainte de începerea extracţiei, se dizolvă 100 mM (1,75 g) de cisteină în 100 ml *soluţie tampon de extracţie* (reactiv 5) şi se recorectează pH-ul la valoarea iniţială. Soluţia tampon de extracţie cu cisteină este stabilă 24 de ore la +4°C. Extracţia β-amilazei se efectuează în raportul 0,5 g material biologic la 5 ml soluţie tampon (reactiv 5) sau 5 ml soluţie tampon plus cisteină, timp de 1 oră, la temperatura de +4°C. Extractul enzimatic se va separa prin centrifugare timp de 15 minute la 4000 rot/min. Deoarece în extract poate fi prezentă şi α-amilaza, este necesară

inactivarea acesteia, care se realizează prin aducerea pH-ului extractului enzimatic la valoarea de 3,6 cu ajutorul unei soluţii de acid acetic 1N. Adăugarea acidului acetic se va face sub continuă agitare iar pH-ul se va măsura la pH-metru. După corectarea pH-ului, volumul amestecului se aduce la 6 ml cu apă bidistilată. Amestecul va fi apoi centrifugat 15 minute la 4000 rot/min pentru eliminarea α-amilazei denaturate ce va sedimenta sub formă de precipitat la fundul eprubetei. Supernatantul va fi folosit drept sursă de β-amilază.

C) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII AMILAZELOR TOTALE, α-AMILAZEI SAU β-AMILAZEI. În eprubete curate şi uscate de 20 ml se vor efectua proba şi martorul, conform indicaţiilor din tabelul de mai jos.

Reactiv	PROBĂ	MARTOR
Soluţie tampon acid citric - citrat 0,1M cu pH=5,6 (ml)	5	5
Soluţie de amidon 2% (ml)	2	-
Apă distilată (ml)	-	2
	AGITARE	
	TERMOSTATARE 5 MINUTE Incubare timp de 10 minute la 40°C (***numai proba !***)	-
Extract enzimatic (ml)	0,1 – 2	-
	AGITARE ŞI TERMOSTATARE 15 MINUTE LA 40°C (***numai proba !***)	-
	RĂCIRE 5 min. LA JET DE APĂ (***numai proba !***)	
Extract enzimatic (ml)	-	0,1 - 2

De notat că martorul se va efectua de aşa manieră încât să fie gata simultan cu proba pentru a evita producerea reacţiei pe baza amidonului şi enzimei existente în extractul enzimatic. Atât în probă cât şi în martor se dozează cantitatea de maltoză eliberată sub acţiunea amilazelor totale, α-amilazei sau β-amilazei asupra amidonului.

D) DOZAREA MALTOZEI. Se vor folosi eprubete ***curate şi uscate*** de 20 ml, termorezistente. De reţinut că alcalinitatea reactivului de culoare denaturează enzima întrerupând reacţia enzimatică.

Reactiv	PROBĂ	MARTOR	CONTROL
Soluţie de acid 3,5-dinitrosalicilic (ml)	1	1	1
Incubat probă (ml)	0,5 - 2	-	-
Amestec de reacţie martor (ml)	-	0,5 - 2	-
Apă distilată (ml)	-	-	0,5 - 2

Toate eprubetele se vor introduce în baie de apă la fierbere şi se menţin exact 5 minute din momentul în care apa reîncepe să fiarbă. Se vor răci eprubetele la jet de apă. Apoi volumul lor se completează la 10 ml cu apă distilată. Se agită energic după care se citeşte la spectrofotometru la λ=540 nm faţă de control.

Pentru aflarea cantităţii de maltoză atât în probă cât şi în martor se foloseşte o curbă etalon construită cu o soluţie standard de maltoză.

E) CONSTRUIREA CURBEI ETALON PENTRU MALTOZĂ. Se realizează o serie de eşantioane etalon cu cantităţi de maltoză variind între 0,2 - 1,8 mg care sunt tratate pentru obţinerea reacţiei de culoare conform tabelului următor.

Eprubeta	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cantitatea de maltoză (mg)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8
Soluţie etalon de maltoză (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Apă distilată (ml)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1
Soluţie de acid 3,5 – dinitrosalicilic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Eprubetele se introduc într-o baie de apă la fierbere şi se menţin exact 5 minute din momentul în care apa reîncepe să fiarbă. După aceasta eprubetele se răcesc în apă de robinet (**ATENŢIE LA DIFERENŢELE DE TEMPERATURĂ!!!**). Se completează volumul probelor la 10 ml cu apă distilată. Se agită conţinutul eprubetelor şi se citesc valorile extincţiilor probelor la spectrofotometru la λ=540 nm faţă de controlul (C) reactivilor. Curba etalon se va trasa trecând pe abscisă cantitatea de maltoză (mg) în probele etalon, iar pe ordonată valorile extincţiilor corespunzătoare.

Calculul rezultatelor. Extincţiile probei şi martorului se extrapolează pe curba etalon, aflându-se cantitatea de maltoză rezultată prin acţiunea α-amilazei sau β-amilazei asupra amidonului, respectiv cantitatea de maltoză existentă în extractul enzimatic. Din cantitatea de maltoză din proba de cercetat se scade conţinutul de maltoză al extractului enzimatic.

Activitatea amilazelor totale sau α-amilazei sau β-amilazei se exprimă în unităţi amilazice, adică μM maltoză formaţi sub acţiunea enzimei dintr-un gram de material vegetal analizat în timp de 1 minut:

$$micromoli\ maltoza / g / \min = \frac{(a_{cer} - a_m) \times (7 + v) \times V}{n \times v \times p \times 0{,}360 \times 15}$$, în care:

a_{cer} - cantitatea de maltoză (mg) corespunzătoare extincţiei probei de cercetat;

a_m - cantitatea de maltoză (mg) corespunzătoare martorului;

v – volumul (ml) de extract enzimatic folosit la determinarea activității enzimei;

V - volumul total (ml) al extractului enzimatic;

n - volumul (ml) de incubat luat pentru dozarea maltozei;

p - greutatea materialului vegetal (g) din care s-a extras enzima;

0,360 - greutatea unui micromol de maltoză exprimată în miligrame;

15 – timpul de incubare.

OBSERVAȚII: 1. Activitatea amilazică a extractului enzimatic netratat termic poate fi considerată ca activitatea amilazelor totale (α-amilazei şi β-amilazei solubile)

2. Diferența dintre activitatea amilazică a extractului enzimatic, netratat şi tratat termic la 70°C poate fi apreciată ca activitatea β-amilazei solubile.

I.3.1.1.4. Determinarea activității α-amilazei și β-amilazei sintetizate de microorganisme (metoda Noelting-Bernfeld)

Amilazele sunt răspândite atât în plante şi animale cât şi la microorganisme (bacterii şi fungi). α-Amilazele sunt produse în cantităţi mari ca enzime extracelulare de unele mucegaiuri (*Aspergillus oryzae, Aspergillus niger*, unele specii de *Mucor* etc.) şi de unele bacterii (*Bacillus subtilis, Bacillus polymixa, Clostridium acetobacter* şi specii ale genului *Streptomyces*).

β-Amilazele au fost descoperite ca enzime extracelulare la speciile genului *Bacillus* şi *Streptomyces*.

Amilazele extracelulare au funcţia de a hidroliza nutrienţii de tipul α-D-glucanilor (amidon, amilopectină, amiloză, glicogen, dextrine) din mediul de cultură, rezultând compuşi cu molecule mai mici ce pot fi metabolizaţi de celulele microbiene.

Amilazele bacteriene şi fungice deţin supremaţia în topul preparatelor enzimatice comerciale obţinute prin biotehnologii industriale moderne. Amilazele microbiene pot fi obţinute în cantităţi practic nelimitate, randamentul şi productivitatea procesului de biosinteză fiind previzibile şi uşor de controlat.

Principiul metodei. Acelaşi ca la *Lucrarea I.3.1.1.3*

Reactivi. *1) Soluţie tampon acid citric-citrat trisodic 0,1 M cu pH 5,6* (vezi Reactiv 1 la *Lucrarea I.3.1.1.3*).

2) Soluţie de amidon 2 % (vezi Reactiv 3 la *Lucrarea I.3.1.1.3*).

3) Soluţie de acid 3,5-dinitrosalicilic 1 % (vezi Reactiv 4 la *Lucrarea I.3.1.1.3*).

4) Soluţie etalon de maltoză (vezi Reactiv 5 la Lucrarea *I.3.1.1.3*).

Modul de lucru. *A) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII AMILAZELOR TOTALE* se realizează după protocolul de la *Lucrarea I.3.1.1.3*, utilizând 0,2 – 1,0 ml lichid de cultură obţinut prin centrifugarea mediului pe care s-a cultivat microorganismul cercetat.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII α-AMILAZEI se efectuează după acelaşi protocol, în 0,5 - 1,0 ml lichid de cultură, impunându-se însă inactivarea β-amilazei prin termostatare timp de 15 minute la 70°C, în prezenţa ionului de calciu, aşa cum se descrie la extracţia α-amilazei (vezi punctul A la *Lucrarea I.3.1.1.3*).

C) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII β-AMILAZEI se bazează pe acelaşi protocol de lucru, utilizând 0,5 – 1,0 ml preparat enzimatic rezultat după inactivarea α-amilazei prin acidularea lichidului de cultură (vezi punctul B de la *Lucrarea I.3.1.1.3*).

D) DOZAREA MALTOZEI. Se va proceda după indicaţiile de la punctele D şi E din modul de lucru al *Lucrării I.3.1.1.3*.

I. 3. 1. 1. 5. Determinarea activității γ-amilazei

γ-Amilaza (E.C. 3.2.1.3) catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor α-1,4-glicozidice din moleculele glicogenului, amidonului şi dextrinelor limită cu formarea D-glucozei ca produs de reacţie.

Principiul metodei. Activitatea catalitică a γ-amilazei se estimează după cantitatea de glucoză formată din amidon sau glicogen sub acţiunea enzimei într-un timp dat, în condiţii optime de reacţie.

Reactivi. *1) Soluţie de amidon 2 % în apă bidistilată* (vezi Reactiv 3, *Lucrarea I.3.1.1.3*).

2) Soluţie tampon acetat de sodiu – acid acetic 0,05 M cu pH=5,6 pentru enzima din microorganisme. O cantitate de 0,7416 g de acetat de sodiu anhidru (CH_3COONa) sau 1,2298 g de $CH_3COONa{\cdot}3H_2O$ se dizolvă în 150 ml apă bidistilată. La soluţia obţinută se adaugă 0,055 ml acid acetic glacial, se corectează eventual pH-ul la 5,6 şi apoi se completează la 200 ml cu apă bidistilată.

3) Soluţie tampon acid acetic – acetat de sodiu 0,1 M cu pH=4,8 pentru enzima din ţesuturile animale. Se dizolvă 8,1636 g acetat de sodiu ($CH_3COONa{\cdot}3H_2O$) în 500 ml de apă bidistilată, într-un balon cotat de 1000 ml. Se adaugă 2,31 ml acid acetic glacial şi, eventual, se corectează pH-ul la 4,8. Se completează la 1000 ml cu apă bidistilată.

4) Soluţie de sulfat de cupru 4,25 %. Se dizolvă 34,6 g sulfat de cupru cristalizat în 500 ml de apă distilată la balon cotat.

5) Soluţie alcalină de tartrat dublu de sodiu şi potasiu. 173 g de tartrat dublu de sodiu şi potasiu (sare Seignette) se dizolvă în 300 ml de apă distilată. Soluţia obţinută se amestecă cu 100 ml soluţie de NaOH 50 %. Amestecul se agită, se răceşte şi se completează la 500 ml.

6) Soluţie de iodură de potasiu 30 %.

7) Soluţie de acid sulfuric 25 %. La 75 ml apă distilată se adaugă cu picătura şi sub agitare, cu atenţie, 25 ml de acid sulfuric concentrat.

8) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,05 N. O cantitate de 12,5 g de tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3{\cdot}5H_2O$) se dizolvă în 1000 ml apă distilată, fiartă şi răcită la temperatura camerei. Se stabileşte factorul (F) soluţiei de tiosulfat de sodiu cu ajutorul unei soluţii de dicromat de potasiu 0,05 N.

Modul de lucru. În două flacoane conice de 100 ml se introduc 3 ml soluţie de amidon 2% şi 2 ml soluţie tampon acetat cu pH=5,6 (în cazul enzimei animale se foloseşte tampon acetat 0,1 M cu pH=4,8). Flacoanele se incubează timp de 5 minute la 60°C (enzima animală la 37°C) după care se adaugă într-unul din flacoane (proba) 1 ml soluţie de enzimă, iar în celălalt (martorul) 1 ml apă distilată. Flacoanele se vor incuba din nou: enzima microbiană - 10 minute la 60°C, enzima animală - 30 minute la 37°C.

Acţiunea γ-amilazei este stopată prin adăugarea în cele două flacoane a câte 2 ml de soluţie alcalină de tartrat dublu de sodiu şi potasiu şi 2 ml de soluţie de sulfat de cupru. Flacoanele se introduc timp de 10 minute într-o baie de apă la fierbere. După răcire se adaugă 2 ml soluţie de

iodură de potasiu 30 % şi 2 ml soluţie de acid sulfuric 25 %. Iodul eliberat se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,05 N până la dispariţia culorii albastru-violet.

Calculul rezultatelor. Ca unitate de activitate a γ-amilazei se consideră acea cantitate de enzimă care catalizează scindarea unui micromol de glucoză în timp de 1 minut, în condiţiile optime de reacţie.

Activitatea γ-amilazei, exprimată în unităţi amilazice (U.A.) într-un mililitru de soluţie enzimatică se calculează după formula:

$$UA = \frac{(V_1 - V_2).F.1,6}{t.0,1801}$$, unde:

V_1 - volumul soluţiei de tiosulfat de sodiu 0,05 N consumată la titrarea martorului (ml);
V_2 - volumul soluţiei de tiosulfat de sodiu 0,05 N consumată la titrarea probei (ml);
F - factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu 0,05 N;
t - timpul de incubaţie;
1,6 - cantitatea de glucoză în mg corespunzătoare la 1 ml soluţie de tiosulfat de sodiu 0,05 N;
0,1801 - masa (mg) a unui micromol de glucoză.

I.3.1.1.6. Evidențierea izoenzimelor α-amilazei și β-amilazei cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă (metoda Vlad Artenie și Marius Mihășan)

Principiul metodei. Formele moleculare ale α- amilazei sau β-amilazei din celulele animale, vegetale sau microbiene se separă prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, în sistem vertical și condiții nedenaturante. Izoenzimele amilazice separate se evidențiază prin imersarea electroforegramelor în soluție de amidon, ulterior în soluție de iod. Izoamilazele apar ca benzi deschise pe fondul întunecat al gelului de poliacrilamidă.

Reactivi. *1) Soluție de acrilamidă și bisacrilamidă (T=30%; C=26,5%).* 29,2 g acrilamidă și 0,8 g bisacrilamidă se dizolvă în 70 ml apă bidistilată. După dizolvarea completă a celor două substanțe se aduce volumul final la 100 ml. Soluția obținută se filtrează și se păstrează în sticlă brună la 4°C. În aceste condiții, soluția de acrilamidă-bisacrilamidă este stabilă cel puțin 30 zile (cu timpul, cantitatea de acid acrilic și amoniac, rezultați prin hidroliza acrilamidei, crește, indiferent de condițiile de păstrare).

2) Soluție tampon Tris-HCl 1,5 M cu pH 8,8 pentru gelul de separare. Se dizolvă 18,17 g Tris în 75 ml apă bidistilată. După ce se ajustează pH-ul la 8,8 cu acid clorhidric concentrat, se completează volumul final la 100 ml cu apă bidistilată. Soluția este stabilă mai multe luni dacă se păstrează la 4°C.

3) Soluție tampon Tris-HCl 0,5 M cu pH 6,8 pentru gelul de concentrare. Se dizolvă 3,03 g Tris în 25 ml apă bidistilată, se ajustează pH-ul la 6,8 cu soluție de acid clorhidric 1 N și se completează volumul final la 50 ml. Prin păstrare la 4°C această soluție tampon este stabilă mai multe luni. Înainte de folosire se verifică pH-ul soluției.

4) Soluție de persulfat de amoniu 10 %. Cantitatea de 100 mg persulfat de amoniu se dizolvă într-un ml de apă bidistilată. Soluția este stabilă cel mult 10 zile, dacă se păstrează la întuneric și la 4°C. Cel mai bine este să se prepare de fiecare dată soluție proaspătă de persulfat de amoniu (Popescu V. Octavian, 1990).

5) Tetrametiletilendiamină (TEMED)

6) Soluție albastru de bromfenol 1%.

7) Soluție tampon de migrare Tris 25 mM – glicocol 192 mM. Se dizolvă succesiv în 800 ml apă distilată 14,4 g glicocol (glicină sau acid aminoacetic) și 3 g Tris. Se corectează pH-ul soluției la 8,3 și se completează volumul final la 1000 ml.

8) Soluție tampon acid citric-citrat trisodic 0,1 M cu pH 5,6 (vezi Reactiv 1, *Lucrarea I.3.1.1.3*).

9) Soluție de amidon 1 % și clorură de calciu 0,02 M în soluție tampon acid citric-citrat trisodic 0,1 M, cu pH 5,6. În 50 ml soluție tampon acid citric-citrat 0,1 M se suspendă 2,5 g de amidon și 1,387 g clorură de calciu anhidră ($CaCl_2$). Un volum de 200 ml soluție tampon acid

citric-citrat se aduce la fierbere, după care se amestecă cu suspensia de amidon şi clorură de calciu. Se spală de 2-3 ori paharul cu amestecul cald şi se mai fierbe încă 2-3 minute până la clarificarea soluţiei.

10) Soluţie de iod N/3000. Se va prepara extemporaneu (la momentul utilizării) prin diluarea a 0,66 ml soluţie de iod N/10 (vezi Reactiv 4, *Lucrarea I.1.7*) cu apă distilată într-un balon cotat de 200 ml.

11) Soluţie de acid acetic 5 % în metanol 30 %. Într-un balon cotat de 250 ml se măsoară 75 ml metanol absolut şi 12,5 ml de acid acetic glacial. Se aduce la semn cu apă distilată.

Modul de lucru. Se prepară mai întâi gelul de separare 8 %, apoi gelul de concentrare 5 %. Volumul celor două geluri se alege în funcţie de dimensiunile camerei de electroforeză. În tabelul de mai jos dăm compoziţia celor două geluri pentru două volume diferite de amestec de reactivi.

Compoziţia gelului de separare 8 %		
Volumul amestecului de reactivi	10 ml	15 ml
Componentele amestecului	ml	ml
Soluţie acrilamidă-bisacrilamidă 30 %	2,7	4,0
Soluţie tampon Tris 1,5 M cu pH 8,8	2,5	3,8
Soluţie persulfat de amoniu 10 %	0,1	0,15
Apă bidistilată	4,7	7,04
TEMED	0,006	0,009
Compoziţia gelului de concentrare 5 %		
Volumul amestecului de reactivi	4 ml	5 ml
Soluţie de acrilamidă-bisacrilamidă 30 %	0,67	0,83
Soluţie tampon Tris 0,5 M cu pH 6,8	0,5	0,63
Soluţie persulfat de amoniu 10 %	0,04	0,05
Apă bidistilată	2,786	3,485
TEMED	0,004	0,005

Amestecul de reactivi pentru gelul de separare se toarnă între plăcile camerei de electroforeză care se asamblează conform cu instrucţiunile aparatului utilizat. Să nu uităm introducerea la partea superioară a plăcilor a pieptenului pentru marcarea godeurilor în care se vor plasa probele de analizat. După polimerizarea gelului de separare (1 – 3 ore), se toarnă între plăcile pregătite amestecul de reactivi pentru gelul de concentrare. După polimerizarea gelului de concentrare (45-60 minute), se îndepărtează pieptenele şi se aplică probele de analizat. Se introduce în compartimentele celor doi electrozi soluţia tampon de migrare Tris-glicocol. Se cuplează camera de electroforeză la redresorul de curent continuu.

În prima oră, până când frontul colorantului (albastru de bromfenol) intră în gelul de separare, se lucrează la 15 mA per fiecare pereche de plăci, adică pentru fiecare gel de electroforeză. Mai departe se

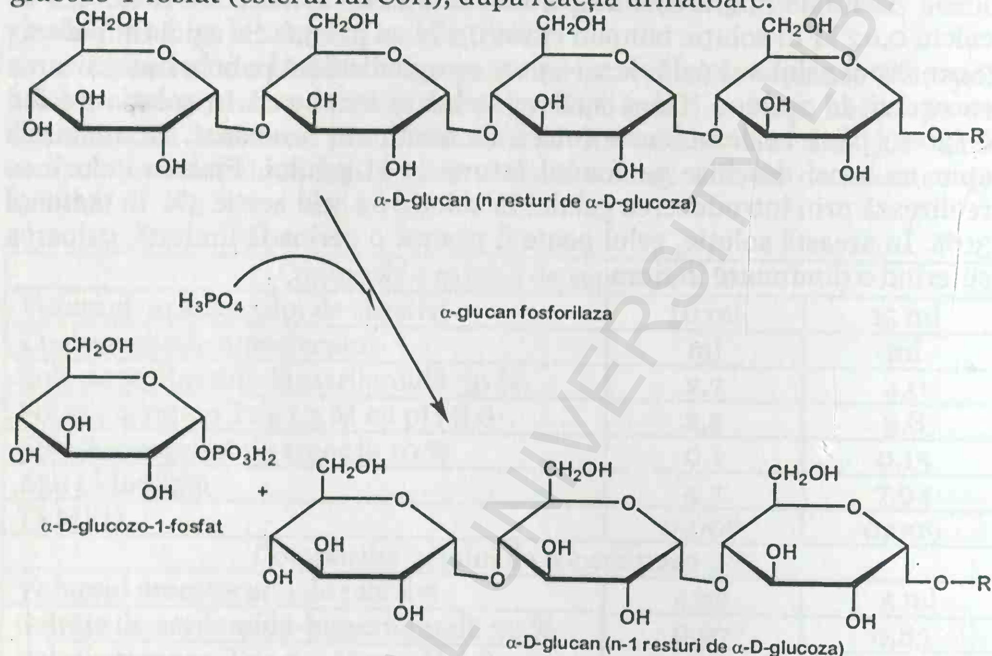
schimbă intensitatea curentului la 30 mA pentru fiecare gel de separare utilizat şi se continuă electroforeza până frontul colorantului ajunge la 0,5 - 1,0 cm de marginea inferioară a gelului.

Se deconectează camera de electroforeză de la redresor. Se desfac plăcile de sticlă şi se îndepărtează gelul de concentrare, iar gelul de migrare se transferă într-o cutie Petri pentru a se realiza evidenţierea izoenzimelor amilazice separate.

Gelul de migrare se acoperă cu soluţia de amidon 1% şi clorură de calciu 0,02 M în soluţie tampon citrat 0,1 M cu pH 5,6. Se agită timp de 2 - 3 ore. Apoi gelul se spală de 2 – 3 ori cu apă distilată pentru îndepărtarea excesului de amidon. După spălare, gelul se incubează în soluţia de iod N/3000 până la dezvoltarea culorii cu amidonul nescindat. Izoamilazele apar ca benzi deschise pe fondul întunecat al gelului. Fixarea culorii se realizează prin introducerea gelului în soluţie de acid acetic 5% în metanol 30%. În această soluţie, gelul poate fi păstrat o perioadă limitată, culoarea suferind o diminuare în timp.

I.3.1.2. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII α - GLUCAN FOSFORILAZEI VEGETALE

Enzima α-glucanfosforilaza (α-1,4-glucan:ortofosfat-glucoziltransferaza, E.C.2.4.1.1), cunoscută şi sub denumirea de fosforilază, catalizează fosforoliza amidonului sau glicogenului cu formarea de α-D-glucozo-1-fosfat (esterul lui Cori), după reacţia următoare:



Această reacţie este reversibilă atunci când α-glucan fosforilaza acţionează asupra amidonului. Însă enzima sintetizează lanţurile amilozice, pornind de la α-D-glucozo-1-fosfat, numai în prezenţa urmelor de amiloză ca iniţiator al reacţiei.

α-Glucan fosforilaza are largă răspândire în plantele superioare (cereale, leguminoase, cartof), în organismele animale (muşchi, ficat, creier) şi microorganisme.

Principiul metodei. Se determină scăderea cantităţii de acid fosforic în mediul de reacţie ca rezultat al fosforolizei amidonului sub acţiunea α-glucan fosforilazei.

Reactivi. *1) Soluţie tampon de fosfaţi de sodiu M/10 cu pH=7,2.* Se prepară dizolvând 5,1586 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ şi 0,7728 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ în 200 ml apă bidistilată

2) Soluţie de sulfat de magneziu ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) *0,8 %.*

3) Soluţie de clorură de sodiu (NaCl) 0,9 %.

4) Reactiv pentru incubaţie. Se amestecă 60 ml soluţie tampon de fosfaţi de sodiu M/10 (pH 7,2) cu 100 ml soluţie de NaCl 0,9% şi 1ml soluţie de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,8%.

5) Soluție de amidon 3%. Suspensia a 3 g amidon în 20 ml apă bidistilată se amestecă cu 80 ml apă bidistilată la fierbere. Amestecul se fierbe încă 3-5 minute şi după răcire se completează la 100 ml cu apă bidistilată.

6) Soluție de fluorură de sodiu(NaF) M/10. (**ATENȚIE ! REACTIV TOXIC !**). Pentru măsurarea soluției de NaF se va utiliza o pipeta automată sau o pipeta prevăzută cu pară de cauciuc.

7) Soluție de acid tricloracetic 10%.

Modul de lucru. *A) EXTRACȚIA α-GLUCAN FOSFORILAZEI.* O cantitate de 0,200 g de material vegetal se macină (seminţe de cereale, leguminoase etc.) sau se mojarează (cartof, seminţe în curs de germinare, plantule) cu nisip de cuarţ ori sticlă pisată, până la obţinerea unei pudre fine. Amestecul obţinut este trecut cantitativ, cu ajutorul a 5 ml apă bidistilată, răcită la 4°C, într-o eprubetă de centrifugă. Se agită cu intermitenţă, timp de 60 minute. Pentru separarea extractului ce conţine enzima, conţinutul eprubetei se centrifughează timp de 15 minute la 4000 rotaţii/minut. Extractul separat serveşte ca preparat enzimatic.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂȚII α-GLUCAN FOSFORILAZEI
Într-o eprubetă curată şi uscată se măsoară 1 ml soluţie de amidon 3%, 1 ml soluţie de NaF şi 2 ml reactiv pentru incubaţie (reactiv 4). Se adaugă 1 ml extract enzimatic şi se agită conţinutul eprubetei (proba). În altă eprubetă se pipetează 1 ml extract enzimatic (martor). Ambele eprubete se introduc pentru 60 - 120 minute în termostat la 37°C. După termostatare, în fiecare eprubetă se adaugă câte 5 ml soluţie de acid tricloracetic 10%, iar eprubeta martor se completează cu 2 ml reactiv pentru incubaţie, 1 ml soluţie de NaF şi 1 ml apă bidistilată. Conţinutul eprubetelor se agită cu grijă şi, după 15 minute de repaus, se filtrează sau se centrifughează. În filtrat (supernatant) se determină cantitatea de fosfor anorganic.

C) DOZAREA FOSFORULUI ANORGANIC DUPĂ METODA LOWRY ŞI LOPEZ ÎN MODIFICAȚIA LUI SKULACEV.

Principiul metodei. Principiul acestei metode se bazează pe transformarea fosfatului în complex fosfomolibdenic şi reducerea acestuia cu ajutorul acidului ascorbic. Accelerarea reacţiei şi creşterea sensibilităţii metodei se realizează sub acţiunea ionilor de cupru. Formarea şi reducerea complexului fosfomolibdenic au loc în soluţie tampon acetat cu pH 4,0. În aceste condiţii combinaţiile organice fosforice labile sunt mult mai stabile.

Reactivi. *1) Soluție tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,1M cu pH 4,0.* Se dizolvă 2,4491 g acetat de sodiu($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) în circa 500 ml apă bidistilată, într-un balon cotat de 1000 ml. Se adaugă 4,73 ml acid acetic glacial, se corectează pH-ul soluţiei la un pH-metru şi se completează la 1000 ml cu apă bidistilată.

2) Soluție de acetat de sodiu 0,25 M. Se dizolvă 3,4015 g acetat de sodiu în 100 ml apă bidistilată, într-un balon cotat.

3) Soluție de acid ascorbic 1% în soluție de sulfat de cupru 0,001 M. Reactivul este instabil, de aceea se va prepara o cantitate mai mică în

ziua determinării. Mai întâi se dizolvă 0,025 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ în 100 ml apă bidistilată. Apoi în 25 ml soluție de sulfat de cupru se dizolvă 0,25 g acid ascorbic.

4) Soluție de molibdat de amoniu 1% în acid sulfuric 0,05 N. Se adaugă 5 ml soluție de acid sulfuric 1 N la 95 ml apă distilată. În soluția obținută se dizolvă 1 g molibdat de amoniu.

5) Soluție etalon de fosfat monopotasic. O cantitate de 16,47087 mg de fosfat monopotasic (KH_2PO_4) se dizolvă în 250 ml apă bidistilată la balon cotat. În 2 ml din această soluție se află 0,03 mg adică 30 micrograme de fosfor.

Modul de lucru. La 0,1 ml din filtratul (supernatantul) obținut pentru determinarea fosforului se adaugă 0,16 ml acetat de sodiu 0,25 M, apoi 1,74 ml apă bidistilată, 4 ml soluție tampon acetat 0,1 M cu pH 4,0 și 1 ml soluție de acid ascorbic 1%. Se agită conținutul eprubetelor cu atenție. După 10 minute de repaus se introduce în fiecare eprubetă câte 1 ml soluție de molibdat de amoniu 1%. Se agită cu grijă și se lasă în repaus 10 minute.

În paralel cu proba și martorul se efectuează un control pentru reactivi, înlocuindu-se filtratul (supernatantul) și soluția de acetat de sodiu 0,25 M cu apă bidistilată.

Intensitatea colorației probei și martorului se citește la un spectrofotometru la lungimea de undă λ=700 nm, față de controlul reactivilor.

Pentru aflarea cantității de fosfor din probă și martor se construiește o curbă etalon luând între 3 și 30 micrograme de fosfor într-un volum de maximum 2 ml soluție etalon fosfat monopotasic, așa cum se indică în tabelul următor:

Eprubeta	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cantitatea de fosfor (μg)	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Soluție etalon de KH_2PO_4 (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Apă bidistilată (ml)	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Soluție tampon acetat (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Soluție acid ascorbic (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Se agită și se lasă în repaus 10 minute.											
Soluție molibdat de amoniu (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

După 10 minute se citesc extincţiile etaloanelor (eprubetelor 1 – 10) la 700 nm, faţă de controlul reactivilor.
Curba etalon se construieşte trecând pe ordonată valorile extincţiilor citite iar pe abscisă concentraţia fosforului în probă.

Calculul rezultatelor. Extincţia probei şi a martorului se extrapolează pe curba etalon, aflându-se cantităţile corespunzătoare de fosfor. Pentru calcularea cantităţii de fosfor esterificat sub acţiunea α-glucan fosforilazei, din cantitatea de fosfor a martorului, se scade conţinutul de fosfor din probă.

Activitatea enzimei (X) se exprimă în micromoli de fosfor esterificat, în timp de 1 minut, sub acţiunea enzimei dintr-un gram de material biologic, conform formulei de calcul:

$$X = (a_{mar} - a_{cer}) \times \frac{10 \times 5}{0,1 \times 0,2 \times 0,031 \times t}$$

, în care:

a_{mar} şi a_{cer} sunt cantităţile de fosfor anorganic (în mg), corespunzătoare extincţiilor martorului şi, respectiv, probei;

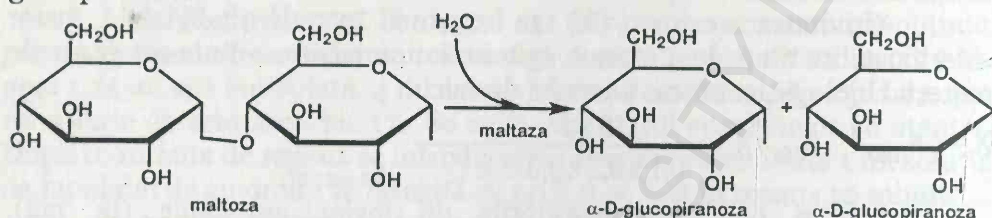
0,031 – masa, în mg, corespunzătoare unui micromol de fosfor esterificat;

t – timpul de incubare, în minute.

I.3.1.3. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII UNOR GLICOZIDAZE

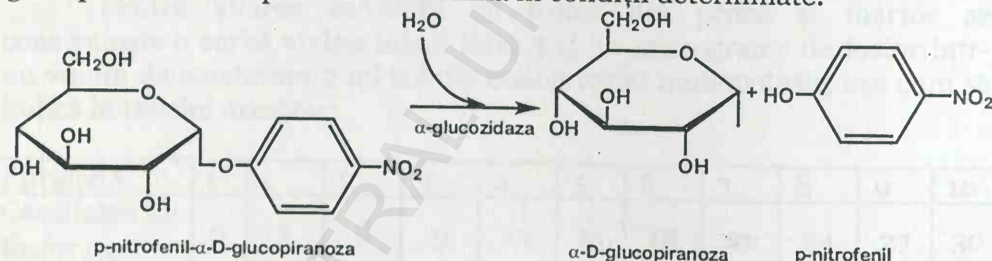
I.3.1.3.1. Determinarea activității α - glucozidazei (protocolul Worthington, adaptat de Vlad Artenie)

α-D-Glucozidaza sau **maltaza** (α-D-glucozid-glucohidrolaza, EC 3.2.1.20) scindează legătura α-1,4-glucozidică în α-D-glucopiranozide, inclusiv maltoza. Din maltoză se obțin două molecule de α-D-glucopiranoză:



Enzima există în salivă, intestin, plante superioare, ciuperci, bacterii.

Principiul metodei. Activitatea catalitică a maltazei se determină prin măsurarea creșterii absorbanței(A) [densității optice(DO) sau extincției(E)] la 400 nm în urma hidrolizei p-nitrofenil-α-D-glucopiranozidului produsă de enzimă în condiții determinate:



Reactivi. *1) Soluție tampon de fosfați de potasiu 0,067 M cu pH 6,8, conținând 0,001 M dithiothreitol.* Într-un flacon cotat de 200 ml se dizolvă 0,9305 g de fosfat monopotasic (KH_2PO_4) și 1,1441 g de fosfat dipotasic (K_2HPO_4) în 150 ml de apă bidistilată. Se adaugă 0,001 M (0,1542 g) dithiothreitol (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$ = 154,2), se corectează pH – ul la 6,8 și se completează la 200 ml cu apă bidistilată.

2) Soluție de p-nitrofenil-α-D-glucopiranozid 0,01 M. Se dizolvă 0,03013 g de p-nitro-α-D-glucopiranozid (PNPG) în 10 ml apă bidistilată. Soluția de PNPG poate fi introdusă în tuburi Eppendorf și congelată pentru utilizare ulterioară. După decongelare, substratul nu mai poate fi recongelat.

Modul de lucru. *A) EXTRACȚIA MALTAZEI.* O cantitate de 0,1 – 0,5 g de intestin subțire (țesut vegetal, biomasa levuriană, fungică sau bacteriană) se omogenizează cu sticlă pisată și se extrage cu 5 ml soluție tampon de fosfați de potasiu 0,067 M și pH 6,8, timp de 60 minute.

Omogenatul se centrifughează la rece timp de 15 minute, la 4000 rot./min. Supernatantul va servi ca sursa de maltază. Înainte de determinare supernatantul se diluează cu soluţie tampon de fosfaţi de potasiu 0,067 M pentru a obţine o viteza de reacţie de 0,02-0,04ΔA/minut. Proteina în soluţia de enzimă poate fi determinată spectrofotometric la 280 nm, când se calculează după formula mg/ml=A_{280}/ml x 0,394 sau prin metoda Bradford.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII MALTAZEI. Se comută spectrofotometrul la 400 nm şi 37°C. În două cuve de 4 ml se măsoară următorii reactivi:

	Probă	Martor
Soluţie tampon de fosfaţi de potasiu 0,067 M, ml	2,8	2,9
Soluţie de PNPG substrat, ml	0,1	0,1

Se introduc cuvele în spectrofotometru şi se lasă 5-7 minute pentru a lua temperatura necesară, după care se etalonează aparatul faţă de blanc. Se adaugă 0,1 ml enzimă diluată în cuva probă şi se amestecă. Imediat se înregistrează creşterea absorbanţei la 400 nm(A_{400}) timp de 5-6 minute. Se calculează ΔA_{400}/minut din porţiunea lineară iniţială a curbei.

Calculul rezultatelor. O unitate de maltază hidrolizează un micromol de p-nitrofenil-α-D-glucopiranozid (PNPG) la 37°C şi pH 6,8 într-un minut. Numărul unităţilor de maltază (UM) într-un ml de extract enzimatic se calculează cu ajutorul formulei:

$$UM/ml = \frac{\Delta A/min \times dilutie \times 3}{8,7 \times volum\ solutie\ diluată\ de\ enzimă}$$, unde:

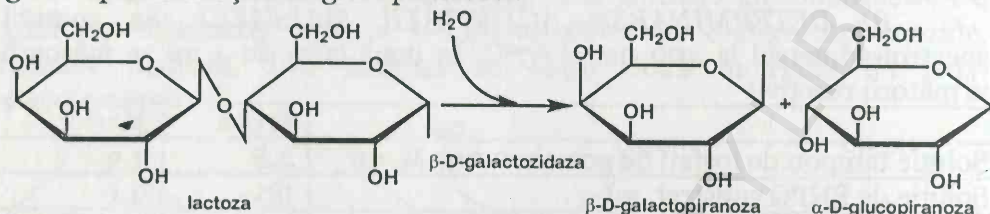
3 – volumul mediului de reacţie, în ml;

8,7 – coeficientul de extincţie molară.

Activitatea maltazei se va exprima în UM la 1 gram de ţesut analizat.

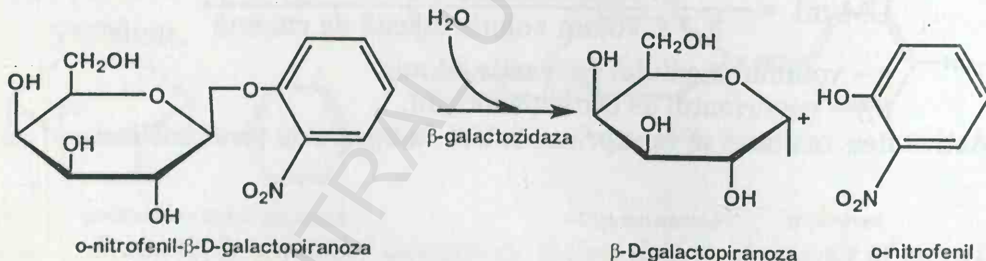
I.3.1.3.2. Determinarea activității β - D - galactozidazei

β-D-Galactozidaza sau **lactaza** (β-D-galactozid-galactohidrolaza, EC 3.2.1.23) este o enzimă din clasa hidrolazelor care hidrolizează restul terminal nereducător de β-D-galactoză din β-D-galactozide. Astfel, lactaza scindează legătura β-1,4 - galactozidică în lactoză, cu formarea β-D-galactopiranozei şi α-D-glucopiranozei:

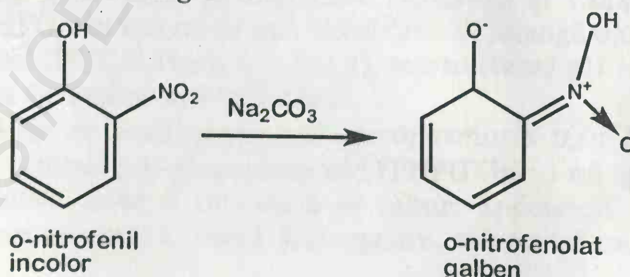


Lactaza se găseşte în glandele mamare şi intestinul subţire ale animalelor, în plante, în drojdiile lactozice, ciuperci şi bacterii. În ţesuturile animale există câteva forme de β-galactozidaze: acide, neutre etc. Condroitin-sulfatul şi keratan-sulfatul conţinând β-galactozide sunt substrate pentru galactozidazele acide.

Principiul metodei. Activitatea β-galactozidazei în celulele eucariotelor superioare, drojdiilor sau bacteriilor poate fi măsurată spectrofotometric, utilizând orto-nitrofenil-β-D-galactopiranozidul (ONPG) în calitate de substrat. Enzima transformă ONPG în orto-nitrofenol:



o-Nitrofenolul este incolor în mediu acid, dar în mediul bazic el se ionizează colorându-se în galben:



Numărul micromolilor de orto-nitrofenol eliberaţi prin hidroliza ONPG sub acţiunea β-galactozidazei se determină spectrofotometric la 400 nm.

Reactivi. *1) Soluţie tampon acetat de sodiu – acid acetic 0,1 M cu pH 4,5.* Într-un balon cotat de 200 ml, se amestecă 0,6468 ml de acid acetic glacial cu circa 150 ml apă distilată. În soluţia obţinută se dizolvă 0,7219 g acetat de sodiu anhidru sau 1,1972 g de $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, se corectează pH – ul la 4,5 cu ajutorul unui pH – metru şi se completează la 200 ml cu apă distilată.

2) Soluţie de ONPG 20 mM în soluţie tampon acetat 0,1 M cu pH 4,5. Se dizolvă 0,0301 g de ONPG în 5 ml soluţie tampon acetat 0,1 M cu pH 4,5. Se conservă la -20°C.

3) Soluţie de carbonat de sodiu 1 M. Se dizolvă 28,616 g de $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ în 100 ml apă distilată, la balon cotat.

4) Soluţie de o – nitrofenol 1 mM. Se dizolvă 0,0139 g de o – nitrofenol în 100 ml apă distilată, la balon cotat.

5) Soluţie de β-galactozidază. Enzima din intestinul subţire, biomasa microbiană sau alte surse se poate extrage prin mojarare, la rece, cu soluţie de tampon acetat 0,1 M (pH 4,5), în raportul 0,5 g ţesut: 5 ml tampon. O sursă accesibilă de β-galactozidază este sucul de *Helix pomatia*.

Modul de lucru. În eprubete de sticlă cu dimensiunile de 10/120 mm se măsoară, în ordinea indicată în tabelul următor, reactivii:

Reactiv	Probă	Martor
Soluţie tampon acetat 0,1 M cu pH 4,5 (ml)	1,6	1,6
Soluţie de ONPG 20 mM în soluţie tampon acetat 0,1 M, cu pH 4,5 (ml)	0,2	0,2
Se agită la vortex şi se preincubează la 37°C, timp de 5 minute		
Soluţie de β-galactozidază în soluţie tampon acetat 0,1 M cu pH 4,5 (ml)	0,2	-
Se agită imediat 15 secunde la vortex şi se incubează exact 15 minute la 37°C		
Soluţie de carbonat de sodiu 1 M (ml)	1	1
Soluţie de β-galactozidază în soluţie tampon acetat 0,1 M cu pH 4,5 (ml)	-	0,2

Adăugarea soluţiei de carbonat de sodiu 1M facilitează deplasarea pH-ul mediului de reacţie spre valoarea 11, determinând, pe de o parte, inactivarea β-galactozidazei iar pe de altă parte ionizarea o-nitrofenolului.

Se citeşte extincţia probei şi martorului la 400 nm, faţă de soluţia tampon acetat.

Calculul rezultatelor. O unitate de activitate a β-D-galactozidazei este definită ca acea cantitate de enzimă care hidrolizează un micromol de o-nitrofenol de la ONPG în timp de un minut la 37°C şi pH optim. Pentru aflarea numărului de micromoli de orto-nitrofenol formaţi per minut de enzima dintr-un ml de lichid biologic sau dintr-un gram de

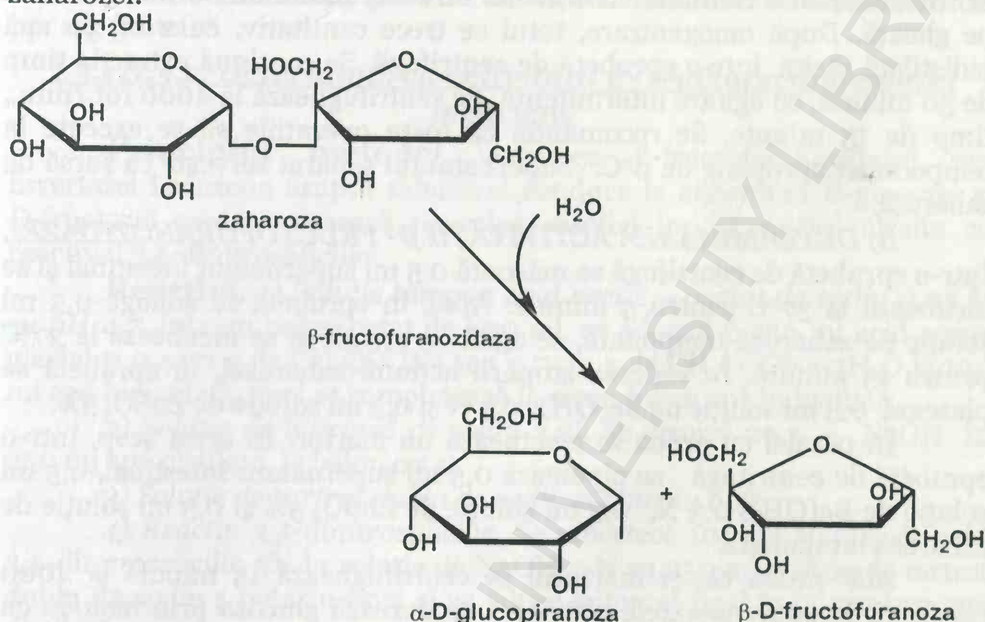
ţesut sau biomasă microbiană se va realiza o serie de etaloane de o-nitrofenol de la 0 la 1 micromol / ml. După ce volumul etaloanelor se completează la 2 ml cu apă distilată, se măsoară în fiecare câte un ml soluţie de carbonat de sodiu 1 M. Se agită şi se citeşte extincţia etaloanelor la 400 nm faţă de apă distilată. Apoi se trasează curba etalon. Extrapolând extincţiile probei şi martorului pe curba etalon se află numărul micromolilor de o-nitrofenol corespunzător cu ajutorul cărora se va calcula activitatea β-galactozidazei din sursa analizată.

OBSERVAŢIE. În cazul determinării β-D-galactozidazei neutre se va utiliza o soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,06 M cu pH 7,0 care se prepara astfel: într-un balon cotat de 1000 ml se introduc 500-600 ml apă bidistilată în care se dizolvă 16,1 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (sau 8,5 g $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$), 5,5 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,75 g KCl şi 0,246 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (sau 0,12 g $MgSO_4$). Se corectează pH-ul la 7 cu soluţie de NaOH 1 N sau cu soluţie de HCl 1N. Se completează la 1000 ml cu apă bidistilată. Se conserva la 4°C. Înainte de utilizare se adaugă 0,270 ml 2-mercaptoetanol în 100 ml soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,06 M cu pH 7,0.

Se va proceda după protocolul de mai sus înlocuind soluţia tampon acetat 0,1 M cu pH 4,5 cu soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,06 M cu pH 7,0.

I.3.1.3.3. Determinarea activității β - fructofuranozidazei

β-D-Fructofuranozidaza, numită înainte **zaharază** sau **invertază** (β-D-fructofuranozid-fructohidrolaza, EC 3.2.1.26) clivează legătura β-glicozidică dintre C-2 al fructozei şi atomul de O din molecula zaharozei:



β-Fructofuranozidaza este larg răspândită în microorgansime (drojdii), plante superioare şi în sucurile digestive ale animalelor.

I.3.1.3.3.1. Determinarea activității β - fructofuranozidazei intestinale (metoda I. S. Lukomskaja, modificată de Vlad Artenie)

Principiul metodei. Activitatea β-fructofuranozidazei poate fi evaluată spectrofotometric prin dozarea D-glucozei rezultată în hidroliza zaharozei cu ajutorul reactivului orto-toluidinic (vezi *Lucrarea I.1.3*).

Reactivi. *1) Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M şi pH 6,0.* Se dizolvă 2,4207 g de fosfat monosodic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) şi 0,3893 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) în aproximativ 150 ml de apă bidistilată, la balon cotat de 200 ml, se corectează pH – ul la 6,0 şi se completează la semn.

2) Soluție de zaharoză 0,056 M în soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M şi pH 6,0. Se dizolvă 1,9169 g de zaharoză în 100 ml soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M şi pH 6,0. Soluția de substrat tamponat se păstrează în volume mici la congelator.

3) Soluție de hidroxid de bariu 0,3 N. Cantitatea de 4,7325 g de $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ se dizolvă în 100 ml apă distilată, la balon cotat.

4) Soluție de sulfat de zinc 5 %.

5) Soluție de acid tricloracetic 3 %.

6) Soluție etalon de D-glucoză. Se dizolvă 100 mg de D-glucoză p.a. anhidră în 100 ml soluție de acid benzoic 0,2%.

7) Reactiv orto-toluidinic. Vezi Reactivul 4 la *Lucrarea I.1.3.*

Modul de lucru. *A) EXTRACȚIA ZAHARAZEI DIN INTESTINUL SUBȚIRE.* O cantitate de 0,050 – 0,100 g de țesut intestinal se triturează cu o cantitate echivalentă de sticlă pisată într-un mojar răcit pe gheață. După omogenizare, totul se trece cantitativ, cu 2 ml de apă bidistilată răcită, într-o eprubetă de centrifugă. Se continuă extracția timp de 30 minute, cu agitare intermitentă. Se centrifughează la 4000 rot./min., timp de 15 minute. Se recomandă ca toate operațiile să se execute la temperaturi apropiate de 0°C. Supernatantul separat servește ca sursă de zaharază.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂȚII β - FRUCTOFURANOZIDAZEI. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,5 ml supernatant intestinal și se incubează la 37°C pentru 5 minute. Apoi, în eprubetă se adaugă 0,5 ml soluție de zaharoză tamponată, se agită cu atenție și se incubează la 37°C pentru 15 minute. În vederea stopării acțiunii zaharazei, în eprubetă se plasează 0,5 ml soluție de $Ba(OH)_2$ 0,3 N și 0,5 ml soluție de $ZnSO_4$ 5%.

În paralel cu proba se efectuează un martor. În acest scop, într-o eprubetă de centrifugă se pipetează 0,5 ml supernatant intestinal, 0,5 ml soluție de $Ba(OH)_2$ 0,3 N, 0,5 ml soluție de $ZnSO_4$ 5% și 0,5 ml soluție de zaharoză tamponată.

Atât proba cât și martorul se centrifughează 15 minute la 4000 rot./min. În supernatantele obținute se dozează glucoza prin metoda cu orto-toluidină (vezi *Lucrarea I.1.3*). La 0,1 ml supernatant se adaugă 0,4 ml acid tricloracetic 3% și 4,5 ml reactiv orto-toluidinic. Cele două eprubete se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă la fierbere.

Într-o a treia eprubetă se măsoară 0,1 ml soluție etalon de glucoză și 0,4 ml soluție de acid tricloracetic 3%. A patra eprubetă cu 0,5 ml soluție de acid tricloracetic 3% va reprezenta controlul. După ce în ultimele două eprubete se adaugă câte 4,5 ml reactiv orto-toluidinic, cele patru eprubete se țin în baie de apă la fierbere timp de 10 minute.

Toate eprubetele se răcesc la temperatura camerei. Se citesc extincțiile probei, martorului și etalonului de glucoză la 630 nm, folosind pentru compensație controlul.

Calculul rezultatelor. Ca unitate a activității zaharazei (UZ) se consideră acea cantitate de enzimă care catalizează hidroliza unui micromol de zaharoză într-un minut.

Deoarece un micromol de zaharoză este hidrolizat într-un micromol de α-D-glucoză și unul de β-D-fructoză, activitatea β-fructofuranozidazei dintr-un gram de țesut proaspăt se poate calcula după formula:

$$UZ = \frac{E_P - E_M}{E_{ET}} \times 100 \times \frac{2}{0,1} \times \frac{2}{0,5} \times \frac{1}{15} \times \frac{1}{p} \times \frac{1}{180,16}$$, unde:

E_P - extincția probei cu zaharază;

E_M – extincţia martorului;
E_{ET} – extincţia etalonului;
100 – concentraţia (mg) glucozei în etalon;
p – greutatea (g) intestinului luat pentru determinare;
180,16 – masa unui micromol de D-glucoză, în mg.

Pentru o mai mare precizie, activitatea zaharazei se exprimă în UZ per mg proteină

I.3.1.3.3.2. Determinarea activităţii β-fructofuranozidazei levuriene

Principiul metodei. Acţiunea β-fructofuranozidazei sau invertazei levuriene asupra zaharozei conduce la eliberarea D-glucozei şi D-fructozei care se dozează pe calea reacţiei lor în mediul alcalin cu reactivul 3,5-dinitrosalicilic.

Reactivi. *1) Soluţie tampon acid acetic – acetat de sodiu 0,05 M cu pH 4,7.* Într-un balon cotat de 200 ml, se adaugă 0,236 ml acid acetic glacial şi 0,4471 g de CH_3COONa sau 0,7414 g de $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ la 100 ml apă bidistilată, apoi se completează la semn tot cu apă bidistilată.

2) Soluţie de hidroxid de sodiu 2 N. Se dizolvă 20,5 g NaOH în 250 ml apă distilată, la balon cotat.

3) Soluţie de tartrat dublu de sodiu şi potasiu 60%.

4) Reactiv 3,5-dinitrosalicilic. Se amestecă 100 ml soluţie de acid 3,5-dinitrosalicilic 5% în soluţie de NaOH 2 N cu 250 ml soluţie de tartrat dublu de sodiu ş potasiu 60% şi se aduce volumul final la 500 ml cu apă distilată.

5) Soluţie de bicarbonat de sodiu 0,1 M. Se dizolvă 0,8401 g de $NaHCO_3$ în 100 ml apă distilată.

6) Soluţie de zaharoză 0,25 M. Se dizolvă 8,5575 g de zaharoză în 100 ml apă bidistilată.

7) Soluţie etalon de D-glucoză 0,005 M şi D-fructoză 0,005 M. O cantitate de 0,0901 g de D-glucoză, respectiv de D-fructoză, se dizolvă în 100 ml apă distilată.

Modul de lucru. *A) EXTRACŢIA INVERTAZEI DIN DROJDIE.* Invertaza este o enzimă intracelulară şi pentru extracţia ei trebuie distrusă membrana celulară. Se suspendă 10 g de drojdie uscată în 30 ml soluţie de bicarbonat de sodiu şi totul se incubează la 40°C pentru 24 de ore. După centrifugare timp de 15 minute la 10.000 rot./min. la rece, supernatantul obţinut va reprezenta sursa de invertază care este stabilă la 5°C câteva luni. Înainte de utilizare, 0,1 ml supernatant se va dilua la 10 ml sau un volum mai mare cu apă bidistilată până la o activitate convenabilă a invertazei.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII INVERTAZEI. La 1 ml soluţie de zaharoză 0,25 M se adaugă 1 ml soluţie tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,05 M cu pH 4,7. Se recomandă ca proba să se execute în dublu exemplar. Se menţin la 40°C timp de 5 minute pentru echilibrarea temperaturii. În fiecare eprubetă se măsoară câte 0,05 ml soluţie diluată de invertază şi se incubează la 40°C timp de 10 minute. După aceasta, în

fiecare probă se introduce 1 ml reactiv 3,5-dinitrosalicilic, se agită şi se plasează eprubetele într-o baie de apă la fierbere pentru 5 minute. După răcire conţinutul eprubetelor se completează la 10 ml cu apă distilată.

În paralel cu probele se execută şi un martor în felul următor: la 1 ml reactiv 3,5-dinitrosalicilic se adaugă 1 ml de apă distilată, 1 ml soluţie tampon acetat, 0,05 ml soluţie diluată de invertază. Se introduce eprubeta cu martorul într-o baie de apă la fierbere pentru 5 minute. Apoi se răceşte şi se completează la 10 ml cu apă distilată.

Extincţiile probelor şi martorului se citesc la un spectrofotometru la 540 nm, faţă de un control constituit din 1 ml reactiv 3,5-dinitrosalicilic şi 9 ml de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Activitatea invertazei se exprimă în micromoli de zaharoză hidrolizată într-un minut. Pentru aflarea micromolilor de zaharoză se construieşte o curbă etalon măsurând 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 şi 1,0 ml dintr-o soluţie etalon conţinând 0,005 M de D-glucoză şi 0,005 M de D-fructoză. Se completează la 1 ml cu apă distilată. În fiecare etalon se adaugă 1 ml soluţie tampon acetat 0,05 M cu pH 4,7 şi câte 1 ml reactiv 3,5-dinitrosalicilic. Eprubetele se introduc într-o baie de apă la fierbere pentru 5 minute. După răcire, se completează volumul etaloanelor la 10 ml cu apă distilată şi se determină extincţia la 540 nm, faţă de eprubeta numai cu apă distilată.

Extincţiile probelor şi martorului se extrapolează pe curba etalon şi se află numărul micromolilor de glucoză care corespunde numărului de micromoli de zaharoză hidrolizată sub acţiunea invertazei. Pentru calculul final se va lua în consideraţie gradul de diluţie a enzimei şi timpul de incubaţie.

I.3.2. ENZIME CARE CATALIZEAZĂ DIFERITE ETAPE DIN METABOLISMUL INTERMEDIAR AL MONOGLUCIDELOR

I.3.2.1. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII FOSFOMONOESTERAZELOR

Fosfomonoesterazele (fosfatazele) sunt larg răspândite în celulele animalelor, plantelor şi microorganismelor, unde îndeplinesc un rol fiziologic deosebit în metabolismul substanţelor. Aceste enzime catalizează scindarea hidrolitică a monoesterilor organici ai acidului orto-fosforic, între care se numără unii intermediari ai metabolismului glucidic (α-D-glucozo-1-fosfatul, D-glucozo-6-fosfatul, D-fructozo-6-fosfatul, D-fructozo-1,6-bisfosfatul, D-sedoheptulozo-1,7-bisfosfatul etc.), metabolismului lipidic (L-glicerol-3-fosfatul, acidul L-α-fosfatidic etc.), precum şi ai altor substanţe.

Fosfomonoesterazele sunt enzime cu o largă specificitate şi se deosebesc între ele după pH-ul optim de acţiune. **Fosfomonoesteraza alcalină** (fosfohidrolaza monoesterilor acidului orto-fosforic, EC 3.1.3.1) sau **fosfataza alcalină** manifestă activitate maximă în mediul alcalin, la un pH = 8,5 – 10,1. **Fosfomonoesteraza acidă** (fosfohidrolaza monoesterilor acidului orto-fosforic, EC 3.1.3.2) sau **fosfataza acidă** reprezintă un amestec de trei enzime având optimul de acţiune la pH 4,6; 3,4 – 4,4 şi 5,2 – 6,2.

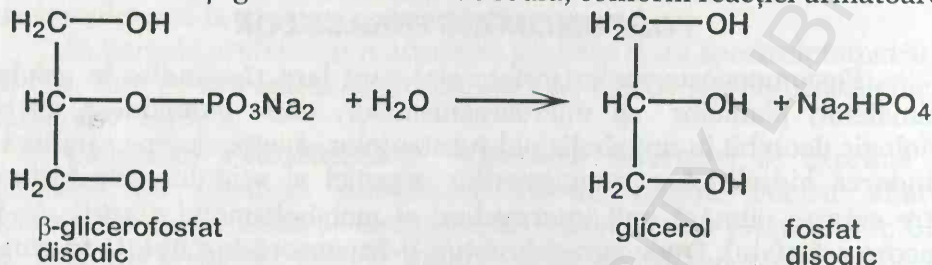
Fosfomonoesteraza alcalină se întâlneşte practic în toate ţesuturile animale. O activitate apreciabilă manifestă enzima din ţesutul osos, ficat, rinichi, glandele mamare, prostată, epiteliul intestinal, leucocite şi serul sanguin. Fosfomonoesteraza acidă este activă în unele ţesuturi animale (splină, ficat, mai ales prostată, eritrocite şi serul sanguin), în seminţele plantelor, cartofi, frunzele verzi, precum şi în microorganisme.

Metodele de determinare a activităţii fosfomonoesterazelor se bazează pe evaluarea cantităţii de fosfor anorganic sau a restului organic scindat sub acţiunea acestor enzime asupra unor combinaţii organice ale acidului fosforic, în condiţii determinate de pH şi temperatură. Între combinaţiile organice ale acidului fosforic folosite pentru determinarea activităţii fosfomonoesterazei alcalină şi acidă se menţionează α- şi β-glicerofosfatul disodic, para-nitrofenilfosfatul etc.

I.3.2.1.1. Determinarea activității fosfomonoesterazelor alcalină și acidă în serul sanguin

I.3.2.1.1.1. Determinarea activității fosfomonoesterazei alcaline (metoda Bodansky)

Principiul metodei. Fosfomonoesterazele din serul sanguin vor cataliza hidroliza β-glicerofosfatului de sodiu, conform reacției următoare:



Fosforul scindat va fi dozat spectrofotometric în urma reacției de culoare cu molibdatul de amoniu în mediu acid.

Reactivi. *1) Soluție substrat tamponat.* Se dizolvă 0,5 g β-glicerofosfat de sodiu și 0,425 g dietilbarbiturat de sodiu (medinal) în 100 ml apă bidistilată la balon cotat (100 ml). Se va verifica pH-ul soluției și se va corecta la valoarea de 8,6. Pentru conservare se adaugă 3 ml eter de petrol sau toluen. Soluția se păstrează la rece.

2) Soluție de acid tricloracetic 10%.

Modul de lucru. *A) ACȚIUNEA ENZIMEI ASUPRA SUBSTRATULUI.* În două eprubete de centrifugă se măsoară câte 2 ml soluție substrat tamponat. Prima eprubetă, reprezentând proba, se introduce într-un termostat la 37°C timp de 5 minute, apoi se adaugă în ea 0,2 ml ser sanguin și se agită, evitându-se aerația. Eprubeta se lasă în termostat la 37°C exact 60 minute.

După trecerea timpului de incubare, prima eprubetă (proba) se scoate din termostat și se inactivează enzima prin adăugarea a 1,8 ml soluție de acid tricloracetic 10%. Conținutul probei se agită bine, se lasă 10 minute în repaus, apoi se centrifughează la 4000 rot./min., timp de 15 minute.

În a doua eprubetă (martor) se adaugă 1,8 ml soluție de acid tricloracetic 10% și 0,2 ml ser sanguin. Conținutul eprubetei se agită, se lasă în repaus 10 minute și se centrifughează în aceleași condiții cu proba.

În supernatantul probei și martorului se dozează fosforul anorganic după metoda de mai jos.

B) *DOZAREA FOSFORULUI ANORGANIC PRIN METODA BELL ȘI DOISY, MODIFICATĂ DE BRIGGS.*

Principiul metodei. La baza acestei metode se află reacția fosforului anorganic din supernatantul deproteinizat cu molibdatul de amoniu în mediu acid, conducând la formarea fosfomolibdatului de amoniu care prin reducere cu sulfit de sodiu și hidrochinonă trece în

albastru de molibden. Intensitatea culorii albastre proporţională cu cantitatea de fosfor din fosfomolibdat se determină spectrofotometric la 600 nm.

Reactivi. *1) Soluţie de molibdat de amoniu 5%.* Se dizolvă 12,5 g molibdat de amoniu în 150 ml apă distilată şi se filtrează într-un balon cotat de 250 ml, apoi se adaugă cu atenţie 37,5 ml acid sulfuric concentrat şi se completează la semn cu apă distilată.

2) Soluţie de sulfit de sodiu 20 %. Se va prepara extemporaneu (la momentul utilizării), în cantităţile strict necesare, pentru a se evita degradarea în timp.

3) Soluţie de hidrochinonă 1%. Se prepară prin dizolvarea 1 g de hidrochinonă în 100 ml apă distilată şi adăugarea a 2 picături de acid sulfuric concentrat pentru conservare. Se va păstra în sticlă brună la rece. **Soluţia poate fi utilizată numai dacă este incoloră.**

4) Soluţie etalon de fosfat monopotasic. Se prepară mai întâi o soluţie stoc dizolvând 0,10985 g fosfat monopotasic în 250 ml apă distilată, la balon cotat. Soluţia conţine 0,1 mg fosfor per ml. Pentru prepararea soluţiei etalon de fosfat monopotasic, se vor dilua 5 ml soluţie concentrată (0,1 mg fosfor/ml) la 50 ml, obţinându-se o soluţie de lucru cu 0,01 mg fosfor per ml.

Modul de lucru. Dozarea fosforului anorganic în supernatantul probei şi martorului se face conform indicaţiilor din tabelul următor:

Reactivi	Control	Probă	Martor
Supernatant probă (ml)	-	2,5	-
Supernatant martor (ml)	-	-	2,5
Apă bidistilată (ml)	3	0,5	0,5
Soluţie molibdat de amoniu 5% (ml)	1	1	1
Pauză 2 minute			
Soluţie sulfit de sodiu (ml)	1	1	1
Pauză 2 minute			
Soluţie hidrochinonă (ml)	1	1	1
Pauză 30 minute			
Citirea extincţiilor probei şi martorului la λ=600 nm, faţă de control			

Pentru aflarea cantităţii de fosfor în probă şi martor, se trasează o curbă de etalonare, pipetând într-o serie de eprubete volume determinate din soluţia etalon de fosfat monopotasic (0,01 mg P/ml) cuprinse între 0,1 – 3,0 ml corespunzând la 0,001 – 0,03 mg fosfor. Se completează la 3 ml cu apă bidistilată. Apoi se adaugă câte 1 ml soluţie de molibdat de amoniu şi la intervale de 2 minute, un ml soluţie de sulfit de sodiu şi un ml soluţie de hidrochinonă. Etaloanele se agită energic şi după 30 minute se citesc extincţiile la 600 nm, faţă de un control conţinând apă bidistilată şi reactivii de culoare.

Calculul rezultatelor. Se determină cantitatea de fosfor în probă şi în martor, raportând extincţiile la curba etalon.

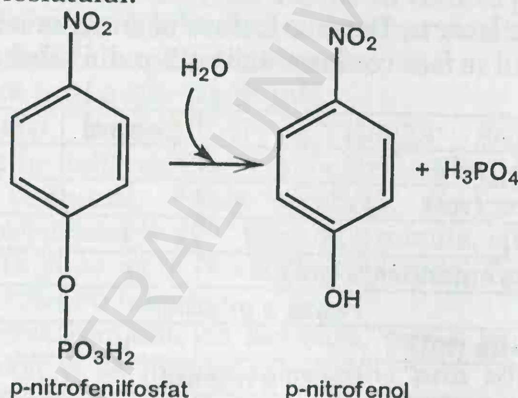
Exprimarea rezultatelor se face în unităţi Bodansky. O unitate de activitate Bodansky corespunde unei activităţi enzimatice care duce la eliberarea unui mg de fosfor anorganic în timp de 60 minute la 37°C. Se va ţine seama de cantitatea de ser luată în lucru şi de faptul că raportarea se face, de obicei, la 100 ml de ser. În consecinţă, activitatea fosfomonoesterazei alcaline se calculează după formula:

$$\text{mg P / 100 ml ser / 60 minute} = \left(a_{cer} - a_{mar}\right) \times \frac{4}{2{,}5} \times \frac{100}{0{,}2},$$

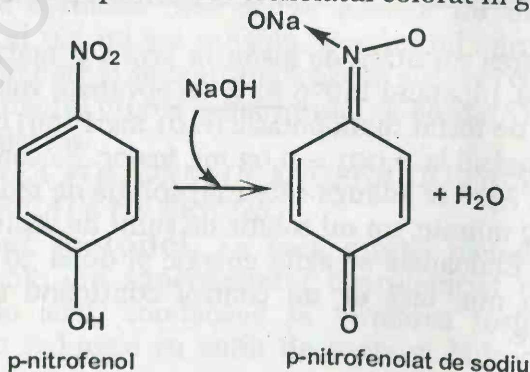
în care: a_{cer} este cantitatea de fosfor (mg) în proba şi
a_{mar} este cantitatea de fosfor (mg) în martor.

I.3.2.1.1.2. Determinarea activităţii fosfomonoesterazei alcaline Metoda cu para-nitrofenilfosfat (metoda Bessey, Lowry, Brock modificată)

Principiul metodei. Fosfomonoesterazele au capacitatea de a hidroliza, în condiţii determinate, legătura esterică în para – nitrofenilfosfat (4-nitrofenilfosfat), cu formarea para – nitrofenolului (4-nitrofenolului) şi fosfatului:



Acţiunea fosfomonoesterazelor este stopată prin adăugarea de soluţie de hidroxid de sodiu. În mediul alcalin para – nitrofenolul eliberat sub acţiunea enzimei dă para – nitrofenolatul colorat în galben intens:



Cantitatea de para – nitrofenolat este direct proporţională cu activitatea fosfomonoesterazei.

Reactivi. *1) Soluţie de hidroxid de sodiu (NaOH) 0,1 N.* O cantitate de 4,2 g NaOH se dizolvă în 1000 ml apă distilată.

2) Soluţie tampon glicocol 0,05 M cu pH 10,5. Se dizolvă 0,37525 g glicocol (glicină) şi 10 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ în 42 ml NaOH 0,1 N. Se corectează pH-ul la 10,5 şi se completează cu apă bidistilată la 100 ml.

3) Soluţie substrat-tampon. Se dizolvă 0,033 g para-nitrofenilfosfat disodic în 20 ml soluţie tampon glicocol 0,05 M cu pH 10,5. Se păstrează o săptămâna la +4°C în sticlă brună, ermetic închisă.

4) Soluţie de NaOH 0,02 N. Se amestecă 200 ml soluţie de hidroxid de sodiu 0,1 N cu 800 ml apă distilată.

5) Soluţie etalon de para-nitrofenol 1,9998 mM. Se dizolvă 0,02782 g para-nitrofenol în 100 ml soluţie de NaOH 0,02 N.

Modul de lucru. Se pregătesc trei eprubete astfel:

Specificaţie	Probă	Martor	Standard
Soluţie substrat-tampon (ml)	1,0	1,0	-
Se incubează 5 minute la 37°C			
Ser sanguin (ml)	0,1	-	-
Soluţie etalon de p-nitrofenol (ml)	-	-	0,1
Se agită bine şi se incubează 30 minute (exact) la 37°C			
Soluţie de NaOH 0,02 N (ml)	10,0	10,0	10,0
Ser sanguin (ml)	-	0,1	-
Apă distilată (ml)	-	-	1,1

Se agită şi se măsoară extincţia probei, martorului şi standardului la 405 nm, faţă de soluţia de NaOH 0,02 N. De reţinut că standardul nu se incubează.

Calculul rezultatelor. Activitatea fosfomonoesterazei alcaline se exprimă în unităţi internaţionale (U.I.). O U.I. corespunde unei activităţi a fosfomonoesterazei alcaline care eliberează un micromol de p-nitrofenol la fiecare minut, în condiţiile specificate.

Deci, activitatea fosfomonoesterazei alcaline în micromoli para-nitrofenol / min / litru (U.I.) se va calcula cu ajutorul formulei:

$$U.I. = \frac{EP - EM}{ES} \times \frac{0{,}02782}{0{,}13911} \times \frac{1}{30} \times \frac{1000}{0{,}1}$$, unde:

EP – extincţia probei;

EM – extincţia martorului;

ES – extincţia standardului;

0,13911 – cantitatea în mg corespunzătoare unui micromol de para-nitrofenol.

Variații fiziopatologice. La oamenii sănătoşi activitatea fosfomonoesterazei alcaline variază cu vârsta: adulţi: 2 – 6 unităţi Bodansky;

13 – 45 U.I. după metoda cu para-nitrofenilfosfat;

copii: 6 – 16 unităţi Bodansky;

38 – 140 U.I. după metoda cu para-nitrofenilfosfat.

În unele stări fiziologice se observă o creştere a activităţii fosfomonoesterazei alcaline. Astfel, această enzimă este deosebit de activă spre sfârşitul sarcinii şi în perioada de alăptare la femei iar la copil în perioada de osificare intensă (creşterea scheletului).

În diferite stări patologice activitatea fosfomonoesterazei alcaline creşte pronunţat, determinarea ei având o deosebită însemnătate clinico-diagnostică. Creşterea activităţii fosfomonoesterazei alcaline se întâlneşte preponderent în unele boli ale oaselor legate de proliferarea osteoblastelor (rahitism prin carenţă de vitamină D, boala lui Paget, hiperparatiroidism, sarcomul oaselor etc.) şi în cazul afecţiunilor hepatice, însoţite de fenomene de colestază (hepatită, insuficienţă cronică, colestază). O creştere a activităţii fosfomonoesterazei alcaline se constată, de asemenea, în bolile muşchiului şi în leucemii.

I.3.2.1.1.3. Determinarea activității fosfomonoesterazei acide

În serul sanguin există unele fosfomonoesteraze cu optim de activitate la pH 4,8. Aceste enzime au provenienţă trombocitară, eritrocitară, osoasă şi prostatică. Din punct de vedere clinic sunt importante fosfomonoesteraza acidă totală şi fosfomonoesteraza acidă prostatică.

Principiul metodei. Fosfomonoesteraza acidă din serul sanguin hidrolizează para-nitrofenilfosfatul în ioni fosfat şi para-nitrofenol (vezi reacţia la fosfomonoesteraza alcalină). Fosfomonoesteraza acidă prostatică este inhibată de L-tartratul de sodiu. Activitatea fosfomonoesterazei acide prostatică se află făcând diferenţă între activitatea fosfomonoesterazei acide totale şi activitatea fosfomonoesterazei acide în prezenţa tartratului.

Reactivi. *1) Soluţie tampon-substrat cu pH 4,8.* Se dizolvă 0,410 g acid citric, 1,125 g citrat trisodic şi 0,165 g para-nitrofenilfosfat disodic în 50 ml apă bidistilată, într-un balon cotat de 100 ml. Se verifică, eventual se corectează pH-ul soluţiei la 4,8 folosind un pH-metru şi se completează cu apă bidistilată la 100 ml. Se conservă maxim 10 zile la +4°C.

2) Soluţie tartrat de sodiu 0,2 M. Se dizolvă 1,15 g de tartrat de sodiu în 25 ml apă bidistilată, la balon cotat.

3) Soluţie etalon de para-nitrofenol. Cantitatea de 0,0139 g de para-nitrofenol se dizolvă în 100 ml soluţie de NaOH 0,02 N.

4) Soluţie de NaOH 0,1 N (vezi Reactiv 1, *Lucrarea I.3.2.1.1.2.*)

5) Soluţie de NaOH 0,02 N. Se amestecă 50 ml soluţie de NaOH exact 0,1 N cu 200 ml apă distilată într-un balon cotat de 250 ml.

Modul de lucru. Pentru determinarea activității fosfomonoesterazei acide totale (FAcT) și fosfomonoesterazei acide neprostatice (FAcNP) se procedează conform indicațiilor din tabelul următor:

Reactivul	Probă FAcT	Probă FAcNP	Martor FAcT	Martor FAcNP
Soluție tampon-substrat (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5
Soluție tartrat de sodiu (ml)	-	0,1	-	0,1
Apă distilată (ml)	0,1	-	0,1	-
Se incubează 5 minute la 37°C				
Ser nehemolizat (ml)	0,2	0,2	-	-
Se agită și se incubează exact pentru 30 minute la 37°C				

La terminarea incubației, în toate eprubetele se măsoară câte 7,3 ml soluție de NaOH 0,02 N. În martor FAcT și martor FAcNP se pipetează câte 0,2 ml ser nehemolizat. Se agită și se citesc extincțiile probelor (FAcT și FAcNP) și martorilor (martor FAcT și martor FAcNP) la lungimea de undă de 405 nm, față de soluția de NaOH 0,02 N.

Calculul rezultatelor. Ca unitate de activitate a fosfomonoesterazei acide se consideră acea cantitate de enzimă care eliberează un micromol de para-nitrofenol în condițiile experimentale specificate.

Pentru aflarea activității fosfomonoesterazei acide totale (FAcT) și neprostatice (F AcNP) se utilizează o curbă etalon care se construiește astfel: în eprubete separate se măsoară 1, 2, 3, 4 și 5 ml soluție etalon de para-nitrofenol, conținând 1, 2, 3, 4 și 5 micromoli de substanță. Volumul fiecărui etalon se completează cu soluție de NaOH 0,02 N la 10,1 ml. Conținutul etaloanelor se agită și se citesc valorile extincțiilor la lungimea de undă de 405 nm, utilizând soluția de NaOH 0,02 N în calitate de control. Pe ordonată se notează valorile extincțiilor, iar pe abscisă – numărul micromolilor de para-nitrofenol în etaloane.

Se scade extincția martorului FAcT din extincția probei FAcT, iar diferența obținută se extrapolează pe curba etalon și se calculează activitatea FAcT în micromoli/min/litru (U.I.). Pentru FAcNP se scade extincția martorului FAcNP din extincția probei FAcNP și prin extrapolare pe curba de etalonare se află activitatea FAcNP în micromoli/min/litru. Facând diferența dintre activitățile FAcT și FAcNP, se obține activitatea fosfomonoesterazei acide de origine prostatică.

Variații fiziopatologice. Activitatea fosfomonoesterazei acide totale (FAcT) în sângele oamenilor sănătoși este cuprinsă între 3 – 11 U.I., iar activitatea fosfomonoesterazei acide prostatică (inhibată de tartrat) variază între 0,2 – 3,5 U.I. FAc totală crește în leucemie, metastaze,

insuficienţă hepatică, trombocitopenie şi boala Paget. FAc prostatică cunoaşte o creştere pronunţată în carcinom prostatic.

OBSERVAŢII. 1. Fosfomonoesteraza acidă din serul sanguin este foarte labilă la temperatura camerei, de aceea se recomandă determinarea activităţii ei imediat după coagularea sângelui.

2. Această enzimă este, de asemenea, foarte sensibilă la urmele de detergenţi de pe sticlăria folosită.

I.3.2.1.1.4. Determinarea activităţii fosfomonoesterazei acide în plante

Principiul metodei. Se bazează pe hidroliza β-glicerofosfatului disodic la un *pH acid* de către fosfomonoesteraza acidă din extractul vegetal, conform reacţiei descrisă la *Lucrarea I.3.2.1.1.1.* Fosforul rezultat în urma acestei reacţii se dozează prin *metoda Bell şi Doisy, modificată de Briggs* (vezi *Lucrarea I.3.2.1.1.1*)

Reactivi. 1) *Soluţie de NaCl 0,9%.*

2) *Soluţie tampon acid citric-citrat de sodiu M/10 cu pH 6,2.* Se dizolvă 1,5130 g acid citric ($C_6H_8O_7{\cdot}H_2O$) şi 15,2864 g citrat de sodiu ($C_6H_5O_7Na_3{\cdot}5H_2O$) în 300 ml apă bidistilată, într-un balon cotat de 500 ml. Se verifică şi se corectează pH-ul soluţiei la pH-metru. Volumul soluţiei se completează la 500 ml cu apă bidistilată.

3) *Soluţie de β-glicerofosfat de sodiu 1,5% în soluţie tampon acid citric-citrat M/10 cu pH 6,2.*

4) *Soluţie de acid tricloracetic 10%.*

Modul de lucru. A) *Extracţia enzimei din materialul vegetal.* Un g material vegetal uscat (făină de grâu, porumb, soia etc.) sau 0,2-0,5 g material vegetal proaspăt (seminţe în curs de germinare, plantule, frunze, tulpini verzi) se mojarează cu 5 ml soluţie de NaCl 0,9%. Omogenatul obţinut se agită cu intermitenţă timp de 60 minute. După extragere se va centrifuga 15 minute la 4000 rot/min. Supernatantul se va folosi ca sursă de enzimă.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII ENZIMEI se realizează conform tabelului următor:

	Probă	Martor
Soluţie de β-glicerofosfat de sodiu (ml)	1	1
Extract enzimatic (ml)	0,5 – 1,0	-
Soluţie de NaCl 0,9 % (ml)	0,5 – 0,0	-
Agitare şi termostatare 30 minute la 37°C		
Soluţie de acid tricloracetic (ml)	3	3
Extract enzimatic	-	0,5 – 1,0
Soluţie de NaCl 0,9 % (ml)	-	0,5 - 0,0
AGITARE ŞI CENTRIFUGARE 15 MIN LA 4000 ROT/MIN		

Supernatantul se va folosi pentru determinarea fosforului anorganic.

C) *DOZAREA FOSFORULUI ANORGANIC.*

Principiul metodei este bazat pe reacţia dintre anionul fosfat existent în supernatantul deproteinizat şi molibdatul de amoniu, conducând la formarea fosfomolibdatului de amoniu. Prin reducerea acestuia cu sulfit de sodiu şi hidrochinonă rezultă albastrul de molibden. Culoarea albastră, proporţională cu cantitatea de anion fosfat din mediu se determină la lungimea de undă de 600 nm.

Reactivi. *1) Soluţie de molibdat de amoniu 5%.* Se dizolvă 12,5 g molibdat de amoniu în 150 ml apă distilată şi se filtrează într-un balon cotat de 250 ml, apoi se adaugă cu atenţie 37,5 ml acid sulfuric concentrat şi se completează la semn cu apă distilată.

2) Soluţie de sulfit de sodiu 20 %. Se va prepara extemporaneu (la momentul utilizării) în cantităţile strict necesare pentru a se evita degradarea în timp.

3) Soluţie de hidrochinonă 1%. Pentru prepararea acestei soluţii se dizolvă 1 g de hidrochinonă în 100 ml apă distilată şi se adaugă 2 picături de acid sulfuric concentrat pentru conservare. Se va păstra în sticlă brună la rece. Soluţia poate fi utilizată numai dacă este incoloră.

4) Soluţie etalon de fosfat monopotasic. Se prepară mai întâi o soluţie stoc dizolvând 0,10985 g fosfat monopotasic în 250 ml apă distilată, la balon cotat. Soluţia conţine 0,1 mg fosfor per ml. Pentru prepararea soluţiei etalon de fosfat monopotasic, se vor dilua 5 ml soluţie concentrată (0,1 mg fosfor/ml) la 50 ml, obţinându-se o soluţie de lucru cu 0,01 mg fosfor per ml.

Modul de lucru. Cantitatea de anion fosfat în mediul de reacţie (supernatant sau filtrat) se determină conform indicaţiilor din tabelul următor:

	Probă	Martor	Control
Supernatant sau filtrat (ml)	0,1 – 2,0	0,1 – 2,0	-
Apă distilată (ml)	2,9 – 1,0	2,9 - 1,0	3
Soluţie molibdat de amoniu (ml)	1	1	1
2 minute repaus			
Soluţie sulfit de sodiu (ml)	1	1	1
2 minute repaus			
Soluţie de hidrochinonă (ml)	1	1	1

Conţinutul eprubetelor se agită cu atenţie şi se lasă în repaus la temperatura camerei. După 30 minute se citesc extincţiile probei şi martorului la 600 nm, faţă de controlul reactivilor (eprubeta cu apă distilată).

Pentru aflarea cantității de fosfor în probe, se trasează o curbă de etalonare, pipetând într-o serie de eprubete volume de soluție etalon de fosfat monopotasic (0,01 mg P/ml) cuprinse între 0,1 – 3,0 ml corespunzând la 0,001 – 0,03 mg fosfor. Se completează la 3 ml cu apă distilată. Apoi se adaugă câte 1 ml soluție de molibdat de amoniu şi la intervale de 2 minute, 1 ml soluție de sulfit de sodiu şi 1 ml soluție de hidrochinonă. Probele se agită energic şi după 30 minute se citeşte extincția la spectrofotometru la 600 nm față de un control conținând 3 ml apă distilată şi reactivii de culoare. Cu valorile obținute se trasează o curbă etalon, trecând pe abscisă mg fosfor în probă iar pe ordonată extincțiile corespunzătoare.

Calculul rezultatelor. Se determină cantitatea de fosfor în probă şi martor, raportând extincțiile respective la curba etalon.

Activitatea fosfomonoesterazei acide se exprimă în micromoli de P eliberat într-un minut de enzima dintr-un gram de material vegetal cercetat, în condițiile experimentale descrise:

$$\text{micromoli P / minut / g} = (a_{cer} - a_{mar}) \times \frac{5}{v} \times \frac{5}{n} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{0{,}031},$$

în care:

a_{cer} – cantitatea (mg) de fosfor din probă(după curba etalon);

a_{mar} – cantitatea (mg) de fosfor din martor(după curba etalon);

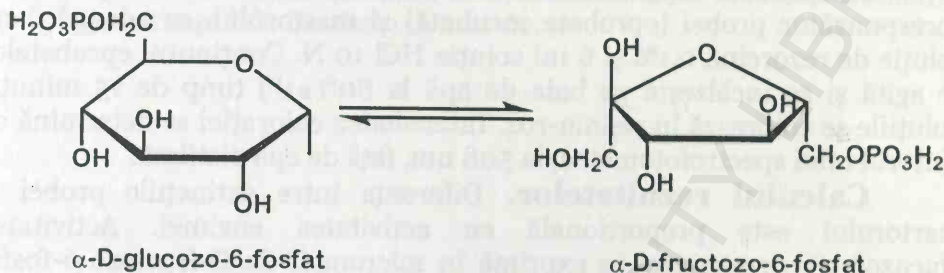
v – volumul (ml) de supernatant luat la dozarea fosforului anorganic;

n – volumul (ml) de extract enzimatic adăugat în probe;

0,031 - masa, în mg, corespunzătoare unui micromol de fosfor scindat de la un micromol de β-glicerofosfat disodic sub acțiunea fosfomonoesterazei acide.

I.3.2.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII GLUCOZOFOSFAT IZOMERAZEI

Glucozofosfat izomeraza (D-glucozo-6-fosfat – cetol-izomeraza, EC 5.3.1.9), enzimă a glicolizei, catalizează reacția reversibilă de izomerizare a D-glucozo-6-fosfatului în D-fructozo-6-fosfat:



α-D-glucozo-6-fosfat α-D-fructozo-6-fosfat

I.3.2.2.1. Determinarea activității glucozofosfat izomerazei în serul sanguin (metoda Bodansky cu unele modificații ale lui Korovkin)

Principiul metodei. Glucozofosfat izomeraza din serul sanguin transformă parțial D-glucozo-6-fosfatul în D-fructozo-6-fosfat. Ultimul formează în prezența HCl concentrat hidroximetilfurfurolul, care reacționează cu rezorcina dând o culoare roșie. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația D-fructozo-6-fosfatului, prin urmare și cu activitatea enzimei.

Reactivi. *1) Soluție de D-glucozo-6-fosfat de sodiu 0,03M.* Se dizolvă 0,2551 mg de D-glucozo-6-fosfat disodic ($C_6H_{11}Na_2O_9P{\cdot}2H_2O$) în 25 ml apă bidistilată, la balon cotat.

2) Soluție tampon medinal-acetat. Se dizolvă 2,9428 g dietilbarbiturat de sodiu (medinal) și 1,9428 g acetat de sodiu în 100 ml apă bidistilată.

3) Soluție substrat tamponat. Se amestecă 8,33 ml soluție de D-glucozo-6-fosfat de sodiu 0,03 M, 25 ml soluție tampon medinal-acetat, 25 ml soluție HCl 0,1 N și se completează cu apă bidistilată la 100 ml (pH-ul soluției trebuie să fie 7,4). Soluția se păstrează în frigider.

4) Soluție de acid tricloracetic 5%.

5) Soluție de rezorcină 0,1% în etanol.

6) Soluție de HCl 10 N. Se amestecă 450 ml de acid clorhidric concentrat cu 50 ml apă distilată.

7) Soluție de HCl 1 N. Se diluează 10 ml soluție de acid clorhidric 10 N la 100 ml cu apă distilată

8) Soluție de HCl 0,1 N. Un volum de 1 ml soluție de acid clorhidric 10 N se adaugă la 99 ml apă distilată.

Modul de lucru. Într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,5 ml ser sanguin diluat cu apă bidistilată 1:2 și 1 ml soluție substrat tamponat (reactiv 3). Amestecul se agită și se incubează în termostat la 37°C timp de

30 minute. După incubare se adaugă 2,5 ml soluţie acid tricloracetic 5%, se agită şi se centrifughează.

În paralel se efectuează un martor, în care se pipetează 0,5 ml ser sanguin diluat cu apă bidistilată 1:2, imediat 2,5 ml soluţie de acid tricloracetic 5% şi apoi 1 ml soluţie substrat tamponat. Se agită şi se centrifughează.

În eprubete separate de 16/180 mm, se iau câte 2 ml supernatant corespunzător probei (eprubeta incubată) şi martorului, se adaugă 2 ml soluţie de rezorcină 0,1% şi 6 ml soluţie HCl 10 N. Conţinutul eprubetelor se agită şi se încălzeşte pe baia de apă la 80°(±1°) timp de 15 minute. Soluţiile se colorează în vişiniu-roz. Intensitatea coloraţiei se determină cu ajutorul unui spectrofotometru, la 508 nm, faţă de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Diferenţa între extincţiile probei şi martorului este proporţională cu activitatea enzimei. Activitatea glucozofosfat izomerazei se exprimă în micromoli de D-fructozo-6-fosfat care se formează sub acţiunea enzimei din 1 ml ser sanguin, în timp de 1 minut, la 37°C.

Pentru aflarea cantităţii de fructozo-6-fosfat în probe se construieşte o curbă etalon. În calitate de substanţă etalon se poate folosi D-fructoza liberă sau sarea de sodiu a D-fructozo-6-fosfatului. Trebuie reţinut că D-fructozo-6-fosfatul dă o coloraţie mai slabă decât fructoza liberă cu rezorcina. Astfel, cu D-fructozo-6-fosfat intensitatea culorii reprezintă numai 62% din intensitatea culorii fructozei libere, raportată la un mol de substanţă, fapt de care trebuie ţinut seama la efectuarea calculelor. În tabelul următor se dă schema de alcătuire a unei serii de probe etalon cu soluţie de D-fructoză (200 micrograme în 2 ml soluţie de HCl 1 N).

Schema alcătuirii seriei etalon pentru D-fructoză.

Nr. probei	D-Fructoză (micrograme)	Soluţie etalon de D-fructoză (ml)	Soluţie de HCl 1N (ml)	Soluţie de rezorcină 0,1% (ml)	Soluţie de HCl 10N (ml)
1	10	0,10	1,90	2	6
2	15	0,15	1,85	2	6
3	25	0,25	1,75	2	6
4	50	0,50	1,50	2	6
5	75	0,75	1,25	2	6
C	0	-	2,00	2	6

După agitarea conţinutului, eprubetele se introduc într-o baie de apă la 80° pentru 15 minute. Apoi se citeşte extincţia probelor 1 – 5 la 508 nm, faţă de controlul reactivilor (C).

Folosindu-se curba etalon construită în modul indicat, activitatea glucozofosfat izomerazei se poate calcula după formula:

micromoli D-fructozo-6-fosfat/ml x minut = ($a_{probă} - a_{martor}$) x 3/0,5 x 1,6/261 x 1/30

unde: a – cantitatea de D-fructoză (micrograme) corespunzătoare probei ($a_{probă}$) şi martorului (a_{martor}), citită pe curba etalon;

3/0,5 - coeficient de calcul pentru 1 ml ser sanguin;

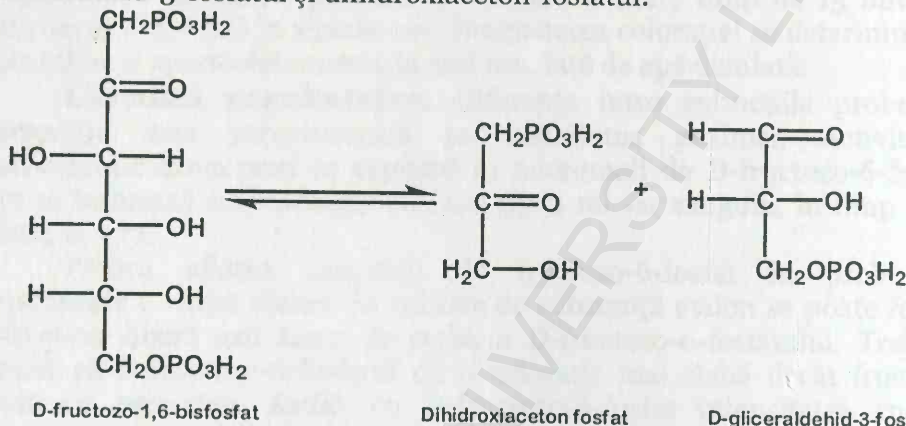
1,6 - coeficient de conversie a D-fructozei în D-fructozo-6-fosfat;

261- masa în micrograme a unui micromol de D-fructozo-6-fosfat;

30 – timpul de incubare în minute.

I.3.2.3. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII FRUCTOZOBISFOSFAT ALDOLAZEI ÎN SERUL SANGUIN (METODA KULGANEK ŞI KLASKA)

Fructozobisfosfat aldolaza (fructozo-1,6-bisfosfat-D-gliceraldehid-3-fosfat - liaza, E.C. 4.1.2.13.) catalizează scindarea reversibilă a D-fructozo-1,6-bisfosfatului în doi triozofosfați izomeri: D-gliceraldehid-3-fosfatul şi dihidroxiaceton-fosfatul:



Fructozobisfosfat aldolaza (aldolaza) este prezentă în organele şi țesuturile omului şi animalelor, în celulele plantelor, de asemenea, în microorganisme, fiind o enzimă importantă a ciclului pentozofosforic reducător (ciclului Calvin), glicolizei, fermentației alcoolice, căii pentozofosfaților (şuntului hexozomonofosfaților) şi gluconeogenezei.

Principiul metodei. Aldolaza scindează D-fructozo-1,6-bisfosfatul în D-gliceraldehid-3-fosfat şi dihidroxiaceton-fosfat. Scindarea are loc în prezența hidrazinclorhidratului care leagă triozofosfații rezultați asigurând desfăşurarea reacției într-un singur sens. Prin hidroliza alcalină a derivaților respectivi se eliberează triozofosfații care formează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina fenilhidrazonele corespunzătoare colorate în maro. Intensitatea culorii este proporțională cu activitatea enzimei.

Reactivi. *1) Soluție de D-fructozo-1,6-bisfosfat 0,005M în soluție de hidrazină 0,056M (pH 8,2).* Într-un balon cotat de 25 ml se dizolvă 0,0625 g de D-fructozo-1,6-bisfosfat disodic în 17 ml apă bidistilată. Se adaugă 0,089 ml hidroxid de hidrazină ($H_2N-NH_2.H_2O$) şi se ajustează pH-ul la 8,2 cu ajutorul unei soluții de HCl 1 N. Se completează la 25 ml cu apă bidistilată.

2) Soluție de HCl 1 N. Se amestecă un volum de 10 ml soluție de acid clorhidric 2 N cu 10 ml apă bidistilată.

3) Soluție de HCl 2 N. Se diluează 45 ml acid clorhidric concentrat la 250 ml cu apă distilată.

4) Soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină 0,6 N. Se dizolvă 100 mg dinitrofenilhidrazină în 100 ml soluţie de HCl 2N.

5) Soluţie de NaOH 0,6 N. Se dizolvă 12,25 g NaOH în 500 ml apă distilată, la balon cotat.

Modul de lucru. La 0,1 ml ser sanguin se adaugă 0,5 ml soluţie de D-fructozo-1,6-bisfosfat în hidrazină şi se incubează 30 minute la 37°C. Reacţia se opreşte prin adăugarea a 0,1 ml soluţie de HCl 2 N. Proteinele nu se îndepărtează şi pentru reacţia de culoare se foloseşte întregul volum al amestecului incubat. În probă se măsoară 0,5 ml soluţie de NaOH 0,6 N, se agită şi se lasă în repaus la temperatura camerei timp de 30 minute. Apoi se adaugă 1,5 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină 0,6 N, se agită şi amestecul se lasă în repaus timp de 30 minute la temperatura camerei. La sfârşitul acestei perioade se introduc în amestec 4,5 ml soluţie de NaOH 0,6 N. După agitare, proba se menţine la întuneric 20 minute. Se citeşte extincţia probei la 536 nm faţă de apă distilată.

În paralel cu proba se realizează un martor în care soluţia de D-fructozo-1,6-bisfosfat în hidrazină se introduce după adăugarea soluţiei de HCl 2 N. Mai departe se procedează în acelaşi mod ca şi la probă.

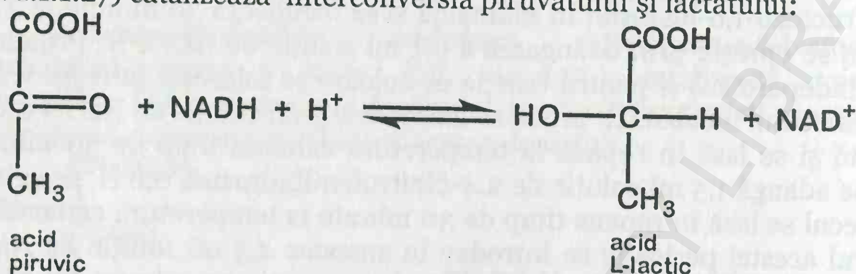
Calculul rezultatelor. Diferenţa între extincţia probei (E_p) şi extincţia martorului (E_m) este proporţională cu activitatea enzimei. Activitatea fructozobisfosfat aldolazei se exprimă în micromoli de D-fructozo-1,6-bisfosfat scindat de enzima dintr-un mililitru de ser sanguin în timp de 1 minut, la 37°C . Pentru construirea curbei etalon se foloseşte dihidroxiacetona. În lipsa acestui reactiv activitatea enzimei se poate exprima în unităţi convenţionale de extincţie: $(E_p - E_m) \times 100$, unde 100 este coeficientul de conversie a valorilor fracţionare ale extincţiei în valori întregi.

Variaţii fiziopatologice. Valoarea normală a activităţii fructozobisfosfat aldolazei în serul sanguin nu depăşeşte 3 - 8 unităţi convenţionale.

Activitatea fructozobisfosfat aldolazei în serul sanguin creşte în bolile ficatului (hepatite, ciroză, colecistite, cancer etc.), în distrofia musculară progresivă (miopatie), infarct miocardic, pancreatită acută hemoragică, anemie hemolitică severă. Cea mai pronunţată creştere a activităţii fructozobisfosfat aldolazei din serul sanguin se evidenţiază în perioada primelor zece zile de la debutul hepatitei virale (boala Botkin).

I.3.2.4. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII LACTAT DEHIDROGENAZEI

Lactat dehidrogenaza (LDH; L-lactat: NAD-oxidoreductaza, E.C. 1.1.1.27) catalizează interconversia piruvatului şi lactatului:



LDH se întâlneşte în majoritatea organelor şi ţesuturilor de origine animală şi vegetală, precum şi în microorganisme, fiind o enzimă importantă a căii glicolitice şi fermentaţiei lactice. La om cea mai mare activitate a LDH s-a decelat în rinichi, muşchiul cardiac, muşchii scheletici, pancreas, splină, ficat, plămâni, ser sanguin.

LDH se găseşte în eritrocite, de aceea *serul sanguin folosit pentru analiză trebuie să fie proaspăt şi fără urme de hemoliză.*

Cercetarea activităţii totale a LDH contribuie la cunoaşterea intensităţii proceselor oxido-reducătoare din organismul animal (uman) iar determinarea activităţii izoenzimelor LDH facilitează stabilirea diagnosticului în unele boli ale inimii, ficatului şi altor organe.

I.3.2.4.1. Determinarea activităţii lactat dehidrogenazei în serul sanguin (metoda Sevela şi Tovarek în modificaţia lui Korovkin, după Vlad Artenie şi Elvira Tănase)

Principiul metodei. Acidul L-lactic în mediu alcalin sub acţiunea LDH din serul sanguin şi a NAD^+ exogen se oxidează în acid piruvic. După cantitatea de piruvat, care se dozează cu ajutorul 2,4-dinitrofenilhidrazinei, se apreciază activitatea enzimei.

Reactivi. *1) Soluţie de lactat de sodiu 0,45 M.* Într-un balon cotat de 100 ml se introduc 5 ml acid L-lactic 80 % (10 ml 40 %) şi se neutralizează cu soluţie de NaOH 2 N până la pH = 7,5. Volumul se completează la semn cu apă bidistilată.

2) Soluţie de pirofosfat de sodiu 0,03 M (pH=8,8). Se dizolvă 6,69 g pirofosfat de sodiu ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$) în 200 - 250 ml apă bidistilată. Se stabileşte pH-ul soluţiei la 8,8 cu ajutorul unei soluţii de HCl 1N şi se completează volumul la 500 ml cu apă bidistilată. Reactivul este stabil în decurs de o lună la frigider.

3) Soluţie de NAD^+. Se dizolvă 6 mg de nicotinamid adenin dinucleotid oxidat (NAD^+) în 2 ml de apă bidistilată. Reactivul este stabil 4 săptămâni la frigider.

4) Soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină 1 mM în soluţie de acid clorhidric 1 N. Se dizolvă 19,8 mg 2,4-dinitrofenilhidrazină în 100 ml soluţie HCl 1 N.

5) Soluţie de NaOH 2 N. Se dizolvă 4,1 g NaOH în 50 ml apă bidistilată, la balon cotat.

6) Soluţie de NaOH 0,4 N. Se dizolvă 8,2 g NaOH în 500 ml apă distilată, la balon cotat.

7) Soluţie de HCl 1N. Se diluează 9 ml de HCl concentrat la 100 ml cu apă bidistilată.

8) Soluţie etalon de piruvat de sodiu. Se dizolvă 12,5 mg piruvat de sodiu în 100 ml apă distilată, la balon cotat.

Modul de lucru. Pentru determinarea activităţii enzimei se va proceda conform tabelului ce urmează:

	Probă	Martor	Amestec de reacţie (eprubeta 3)
Soluţie de NAD^+ (ml)	0,3	0,3	-
Ser sanguin diluat cu apă distilată 1: 2 (ml)	0,1	-	-
Soluţie de pirofosfat de sodiu (ml)	-	-	4
Soluţie de lactat de sodiu (ml)	-	-	1
Incubare pe baie de apă (sau termostat) timp de 5 minute la			37°C
Amestec de reacţie (eprubeta 3) (ml)	1	1	
Agitare uşoară şi incubare 15 minute la 37°C			
Soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină (ml)	0,5	0,5	
Ser sanguin diluat cu apă distilată 1: 2 (ml)	-	0,1	
Agitare uşoară şi repaus 20 minute la temperatura camerei			
Soluţie de NaOH 0,4 N (ml)	5	5	
Agitare uşoară şi repaus 15 minute la temperatura camerei			
Citire la λ=536nm, faţă de apă distilată			

Calculul rezultatelor. Activitatea lactat dehidrogenazei se calculează după curba etalon construită cu soluţie etalon de piruvat de sodiu, conform indicaţiilor din tabelul următor.

Schema construirii curbei de etalonare

Număr eprubetă ⇒	1	2	3	4	5	6
Acid piruvic (μg)	5	10	15	20	25	30
Soluție de piruvat de sodiu (ml)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
Apă distilată (ml)	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3
Soluție de pirofosfat de sodiu (ml)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Soluție de 2,4 - dinitrofenilhidrazină (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agitare ușoară și repaus 20 minute la temperatura camerei						
Soluție de NaOH 0,4 N (ml)	5	5	5	5	5	5
Agitare ușoară și repaus 15 minute la temperatura camerei						
Citire la λ=536nm, față de apă distilată						

Diferența între extincția probei și extincția martorului arată cantitatea de acid piruvic formată în timpul incubației sub acțiunea LDH. Activitatea LDH se exprimă în micromoli acid piruvic rezultați sub acțiunea enzimei dintr-un ml de ser sanguin, în timp de 1 minut la 37°C.

Folosind curba etalon, activitatea lactat dehidrogenazei se poate calcula după formula:

$$\text{micromoli acid piruvic / ml x minut} = (a_{cer} - a_{mar}) \times \frac{3}{0{,}1} \times \frac{1}{15} \times \frac{1}{88}$$

în care: a_{cer} este cantitatea de piruvat (în micrograme) din probă;
a_{mar} este cantitatea de piruvat(în micrograme) din martor, iar
88 reprezintă masa unui micromol de acid piruvic în micrograme.

I.3.2.4.2. Determinarea activității lactat dehidrogenazei în serul sanguin (metoda Wroblewski și La Due, modificată de Hill, după Vlad Artenie și Elvira Tănase)

Principiul metodei. Metoda se bazează pe măsurarea vitezei de oxidare a NADH în timpul reacției de transformare a acidului piruvic în acid lactic. Viteza de oxidare a NADH se estimează după scăderea extincției la 340 nm.

Reactivi. *1) Soluție de piruvat de sodiu 0,01M*. Se dizolvă 27,5 mg piruvat de sodiu în 25 ml soluție tampon de fosfați 0,1 M cu pH 7,8.

2) Soluție de NADH 0,001%. Înainte de utilizare, se dizolvă 3 mg NADH în 3 ml de apă bidistilată.

3) Soluție de carbonat de sodiu 1%.

4) Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1M cu pH 7,8. Se dizolvă 0,2346 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ și 6,5558 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ în 200 ml apă bidistilată, la balon cotat.

5) Amestec de soluție tampon și substrate. În momentul utilizării se prepară amestecul alcătuit din 1 ml soluție de piruvat de sodiu, 25 ml

soluţie tampon de fosfaţi, 1 ml soluţie de carbonat de sodiu şi 3 ml soluţie de NADH. Amestecul se agită cu atenţie.

Modul de lucru. Se măsoară câte 2,9 ml amestec de soluţie tampon-substrate în 2 eprubete şi se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă cu temperatura de 37°C. Apoi, într-o eprubetă (proba) se pipetează repede 0,1 ml ser sanguin diluat cu apă bidistilată (0,1 ml ser + 0,9 ml apă bidistilată, termostatată la 37°C). Conţinutul eprubetei se agită şi se transvazează în cuva spectrofotometrului. Grosimea cuvei să fie de 1 cm. Măsurarea extincţiei probei se face la 340 nm, faţă de soluţia din a doua eprubetă în care s-a adăugat 0,1 ml apă bidistilată. Se citeşte valoarea extincţiei: E_1. Apoi, proba se incubează 30 minute într-o baie de apă la 37°C. Se citeşte a doua extincţiei: E_2.

Calculul rezultatelor. Activitatea LDH se exprimă în milimicromoli de substrat transformat de enzima din un ml ser în timp de 1 minut. Calculul se realizează prin formula:

$$\frac{\text{Milimicromoli piruvat}}{1\text{ ml x 1 minut}} = \frac{\Delta E \text{ x } 100 \text{ x } 1000}{30 \text{ x } 2{,}07},$$

unde: $\Delta E = E_1 - E_2$;

30 – timpul de incubaţie, în minute;

100 – gradul de diluţie a serului;

2,07 – coeficientul de extincţie la 340 nm pentru 1 micromol de NADH conţinut în 3 ml soluţie;

1000 – transformarea în milimicromoli.

I.3.2.4.3. Determinarea activității izoenzimelor lactat dehidrogenazei

În ţesuturile umane şi animale au fost identificate 5 izoenzime ale lactat dehidrogenazei (LDH): LDH_1, LDH_2, LDH_3, LDH_4 şi LDH_5. Molecula oricărei izoenzime a LDH constă din 4 subunităţi polipetidice care pot fi de două tipuri: M (muscle) şi H (heart). Aceste tipuri M şi H sunt determinate genetic, respectiv sinteza lor este controlată de gene diferite. Cele 5 izoenzime ale LDH rezultă din combinarea în proporţii definite a subunităţilor menţionate. Compoziţia izoenzimelor LDH poate fi redată astfel: $LDH_1 - H_4$, $LDH_2 - H_3M$, $LDH_3 - H_2M_2$, $LDH_4 - HM_3$ şi $LDH_5 - M_4$.

Izoenzimele LDH se numerotează în raport cu mobilitatea lor electroforetică la pH=8,3. În gel de amidon şi de poliacrilamidă, LDH_1 este izoenzima cu mobilitatea electroforetică cea mai mare spre anod, iar LDH_5 este izoenzima cu mobilitatea electroforetică cea mai mică; formele hibride LDH_2, LDH_3 şi LDH_4 prezintă mobilităţi intermediare.

Raporturile dintre activităţile celor cinci izoenzime ale LDH sunt caracteristice fiecărui organ. În ţesuturile cu profil metabolic oxidativ (creier, inimă) predomină izoenzimele LDH_1 şi LDH_2; în ţesuturile cu metabolism glicolitic (anaerob) pronunţat cum sunt muşchii striaţi predomină izoenzimele LDH_5 (în special) şi LDH_4. Izoenzimele LDH din

muşchii striaţi şi ficat s-au dovedit mai labile decât izoenzimele LDH din inimă.

I.3.2.4.3.1. Determinarea izoenzimelor lactat dehidrogenazei în serul sanguin, prin adsorbţie pe DEAE-Sephadex (după Manta, Cucuianu, Benga, Hodârnău)

Principiul metodei. Prin amestecarea serului sanguin cu o suspensie de DEAE Sephadex se produce adsorbţia izoenzimei LDH_1, iar după centrifugare se determină activitatea lactat dehidrogenazei (LDH) în supernatant. Diferenţa între activitatea LDH în serul neadsorbit şi în serul adsorbit reprezintă activitatea izoenzimei LDH_1.

Reactivi. *1) Suspensie de DEAE-Sephadex A 50* (50 mg/ml). Înainte de utilizare se agită bine. Se păstrează timp de un an la +4°C.

2) Toţi reactivii necesari pentru determinarea activităţii LDH (vezi *Lucrarea I.3.2.8.1* sau *Lucrarea I.3.2.8.2*).

Modul de lucru. Într-o eprubetă de centrifugă se amestecă 1 ml ser sanguin şi 1 ml suspensie DEAE-Sephadex. Se lasă timp de 10 minute la temperatura camerei (25°C), după care se centrifughează 15 minute la 3000 rotaţii/minut. Se iau apoi 0,1 ml din supernatant şi se determină activitatea LDH (aşa cum s-a arătat mai sus). Se efectuează o determinare a activităţii LDH şi din 0,1 ml ser neadsorbit.

Calculul rezultatelor. Se va ţine cont că în cursul amestecării cu suspensia de DEAE-Sephadex s-a produs o diluare a serului adsorbit de 1,5 ori.

Activitatea LDH adsorbită (de tip miocardic) =
= activitatea LDH globală – 1,5 x activitatea LDH neadsorbită.

I.3.2.4.3.2. Determinarea izoenzimelor LDH prin inactivare termică

Izoenzimele LDH conţinând predominant subunităţi de tip M (LDH_4 şi LDH_5) sunt mai termolabile decât izoenzimele având în compoziţia lor subunităţi H (LDH_1 şi LDH_2).

După Wűst, Schőn şi Berg (1962) în serul sanguin şi omogenatele de ţesuturi există trei grupe de izoenzime ale LDH: 1) LDH termostabilă care îşi păstrează activitatea prin incubare la 65°C timp de 30 minute; 2) o categorie termolabilă care se inactivează la temperatura de 56°C şi 3) o grupă termoindiferentă de izoenzime care se inactivează la temperatura de 65°C dar îşi păstrează activitatea la 56°C. Conform opiniei aceloraşi autori, la prima grupă aparţine LDH_1 (HHHH), la cea de a doua – LDH_5 (MMMM), iar din a treia grupă fac parte LDH_2 (HHHM), LDH_3 (HHMM) şi LDH_4 (HMMM).

Reactivi. *1) Soluţie tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH 7,5*. Se dizolvă 1,2114 g de Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethane] în 200 ml apă bidistilată. După ce se corectează pH-ul la 7,5 cu soluţie de HCl 1 N, se completează la 350 ml cu apă bidistilată.

2) Toţi reactivii necesari pentru determinarea activităţii LDH (vezi *Lucrarea I.3.2.8.1* sau *Lucrarea I.3.2.8.2*).

Modul de lucru. Se amestecă 1 ml ser sanguin cu 1 ml soluţie tampon Tris-HCl 0,05 M şi pH 7,5. Se măsoară câte 0,7 ml amestec în două eprubete mici (10/120 mm) care se închid cu dopuri. Una din eprubete se incubează într-o baie de apă la 56±0,1°C, iar a doua la 65±0,1°C timp de 30 minute. Apoi ambele eprubete se răcesc repede la temperatura camerei. Se determină activitatea LDH în serul sanguin diluat netratat termic (LDH 25°C), în serul diluat (amestecul) incubat la 56°C (LDH 56°C) şi în amestcul incubat la 65°C (LDH 65°C), după una din metodele de determinare a activităţii LDH descrise mai sus.

Calculul rezultatelor. Activitatea izoenzimei LDH_1 = LDH 65°C;
activitatea izoenzimelor $LDH_2 + LDH_3 + LDH_4$ = LDH 56°C – LDH 65°C;
activitatea izoenzimei LDH_5 = LDH 25°C – LDH 56°C.

Valori fiziopatologice. La oamenii sănătoşi activitatea LDH adsorbită (respectiv termostabilă) este de 50 – 70 % din activitatea globală a enzimei.

Valori de peste 80 % din activitatea LDH globală sugerează un infarct miocardic.

I.3.2.4.3.3. Determinarea activităţii fracţiunii lactat dehidrogenazei serice stabilă la uree

În serul sanguin sunt prezente toate cele 5 izoenzime ale lactat dehidrogenazei (LDH): LDH_1, LDH_2, LDH_3, LDH_4 şi LDH_5. S-a stabilit că fracţiunea LDH_1 provine în principal din inimă, iar LDH_5 din ficat. Spre deosebire de LDH_5, prima izoenzimă LDH_1 posedă stabilitate la acţiunea denaturantă a ureei.

Principiul metodei. Ureea are proprietatea de a inhiba 100 % activitatea LDH_5. Determinarea paralelă a activităţii globale a LDH şi a activităţii fracţiunii LDH neinfluenţabilă de către uree, permite calcularea procentului fracţiunii stabile la acţiunea ureei.

Reactivi. *1) Soluţie de uree în soluţie de pirofosfat de sodiu.* Se dizolvă 14,4 g de uree în 100 ml soluţie de pirofosfat de sodiu 0,03 M cu pH 8,8.

2) Reactivii 1 – 7 de la *Lucrarea I.3.2.8.1*.

Modul de lucru. Se amestecă 0,1 ml ser sanguin diluat (1: 2) cu 0,8 ml soluţie de uree în soluţie tampon de pirofosfat de sodiu 0,03 M şi cu 0,3 ml soluţie de NAD^+. Eprubeta se închide cu dop şi se preincubează timp de 60 minute la 25°C. Apoi în eprubetă se adaugă 0,2 ml soluţie de lactat de sodiu 0,45 M, se agită şi se incubează 15 minute la 37°C.

În paralel se determină activitatea globală a LDH, fără încălzirea prealabilă a reactivilor la temperatura de 25°C. După realizarea amestecului de incubaţie cu reactivii având temperatura camerei, eprubeta se incubează imediat timp de 15 minute la 37°C.

După incubaţie, cele două eprubete se supun operaţiile descrise la *Lucrarea I.3.2.8.1*.

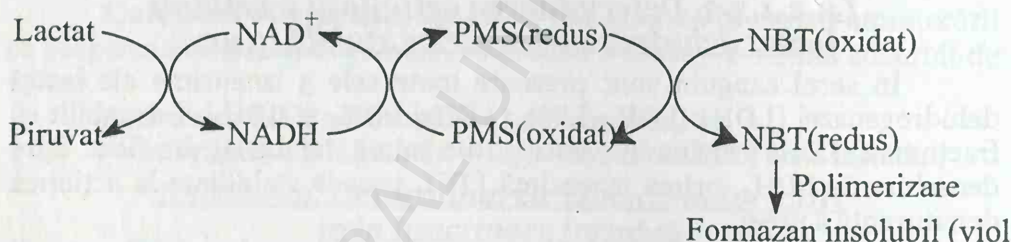
Calculul rezultatelor. Se calculează procentul LDH stabilă la acţiunea ureei, în raport cu activitatea globală a LDH.

Conform datelor din literatura de specialitate fracţiunea LDH stabilă la uree reprezintă 25 – 36 % din activitatea globală a LDH.

În bolile ficatului fracţiunea stabilă la uree scade (<20 %), iar în infarctul miocardic creşte (>40 %).

I.3.2.4.3.4. Separarea şi identificarea izoenzimelor lactat dehidrogenazei prin electroforeză în gel de poliacrilamidă

Principiul metodei. Izoenzimele LDH conţinute într-o probă biologică (ser, omogenat tisular etc.) se separă electroforetic în gel de poliacrilamidă. Fracţiunile LDH separate electroforetic sunt puse în evidenţă prin reacţia cu *nitro blue tetrazolium* (NBT). În acest scop gelul de poliacrilamidă, conţinând izoenzimele LDH, se incubează cu un amestec de lactat, NAD^+, un transportor intermediar de electroni (*metosulfat de fenazină*) şi un acceptor final de electroni (*NBT*). Metosulfatul de fenazină (PMS) transferă atomii de hidrogen de la NADH pe NBT, care se reduce într-un compus colorat violet şi insolubil, denumit formazan violet. Mecanismul de reacţie este următorul:



Diferitele izoenzime ale LDH apar sub forma unor benzi colorate în violet pe mediul de suport şi pot fi determinate cantitativ prin densitometrie.

Reactivi. *1) Soluţiile şi echipamentul pentru elecroforeza în gel de poliacrilamidă*. (Vezi *Lucrarea I.3.1.1.6*).

2) Soluţie tampon de fosfaţi de sodiu sau de potasiu 0,05 M cu pH 7,4. Se dizolvă 0,5244 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ şi 6,3705 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ în 200 ml de apă bidistilată. Se corectează pH-ul la 7,4 şi se diluează la 400 ml cu apă bidistilată.

3) Soluţie tampon Tris-HCl 0,1 M cu pH 9,2. Într-un balon cotat de 250 ml, se dizolvă 3,0285 g de TRIS [Tris(hydroxymethyl)aminomethane] în 150 ml apă bidistilată. pH-ul soluţiei obţinute se corectează la 9,2 cu soluţie de acid clorhidric 1 N şi se completează la semn cu apă bidistilată.

4) Soluţie de lactat de litiu 0,1 M. Se dizolvă 0,9601 g lactat de litiu (CH_3-CHOH-COOLi) în 100 ml apă bidistilată.

5) Soluţie de metosulfat de fenazină (PMS) 10 mg / 10 ml apă bidistilată. Se conservă în sticlă brună la +4°C nu mai mult de 10 zile.

6) Colorant: 96 mg lactat de litiu; 50 mg de nicotinamid adenin dinucleotid (NAD^+) şi 5 mg de NBT în 100 ml soluţie tampon Tris-HCl 0,1

M cu pH 9,2. Această soluţie este stabilă la 4°C şi la întuneric timp de o săptămână. Înainte de utilizare se adaugă 0,5 ml soluţie de metosulfat de fenazină (**Soluţia de colorant nu se expune mult timp la lumină !**).

Modul de lucru. *A) PREGĂTIREA GELULUI DE POLIACRILAMIDĂ.* Se prepară mai întâi 15 ml de gel de migrare (separare) de concentraţie 7% prin amestecarea următoarelor volume de reactivi într-un flacon conic de 50 ml:

Soluţie de acrilamidă-bisacrilamidă 30 % - 3,5 ml;
Soluţie tampon Tris 1,5 M cu pH 8,9 – 3,8 ml;
Apă distilată – 7,54 ml;
Soluţie de persulfat de amoniu 10% - 0,15 ml;
TEMED – 0,0105 ml.

Amestecul obţinut se toarnă cu grijă între plăcile de electroforeză pregătite în prealabil şi fixate în camera de electroforeză. Se introduce 1 ml apă distilată sau mai bine 1 ml de etanol pentru orizontalizarea gelului. Se aşteaptă 60 minute pentru polimerizarea gelului de poliacrilamidă.

În continuare se prepară gelul de concentrare 5 % într-un flacon conic de 25 ml:

Soluţie de acrilamidă-bisacrilamidă 30% - 0,83 ml;
Soluţie tampon Tris 0,5 M cu pH 6,8 – 0,63 ml;
Apă distilată – 3,485 ml;
Soluţie de persulfat de amoniu 10 % - 0,05 ml şi
TEMED - 0,005 ml.

După agitarea conţinutului flaconului, amestecul de reactivi se pipetează cât mai repede posibil între plăcile de electroforeză deasupra gelului de migrare, având fixat pieptenul pentru marcarea locurilor de aplicare a probelor. Se lasă în repaus aproximativ 60 minute pentru polimerizarea gelului de concentrare. Apoi se scoate cu atenţie pieptenul pentru probe şi se absoarbe cu benzi subţiri de hârtie de filtru lichidul din godeuri.

B) PREPARAREA ŞI APLICAREA PROBEI DE CERCETAT. O cantitate de 0,5 – 1,0 g de ţesut animal (ficat, rinichi, muşchi scheletic, miocard, creier, intestin, plămân) se omogenizează la rece cu soluţie tampon de fosfaţi 0,05 M (în raportul 1 g ţesut: 10 ml soluţie tampon). După centrifugare, se păstrează supernatantul pe gheaţă.

În godeurile formate în gelul de poliacrilamidă se introduc 20 - 30 µl probă de analizat şi 10 µl soluţie de albastru de bromfenol pentru controlul separării proteinelor. Godeurile se completează cu soluţie tampon de migrare Tris-glicină cu pH 8,3. Se umplu cuvele electrozilor cu soluţie tampon de migrare.

C) EFECTUAREA ELECTROFOREZEI. Camera de electroforeză se închide cu capacul său şi se stabilesc contactele între electrozi şi redresorul de electroforeză. Până la intrarea probelor în gelul de migrare (aproximativ 60 minute) se aplică o intensitate constantă de 15 mA per placă de gel de poliacrilamidă. Mai departe se lucrează cu o intensitate constantă de 20 – 30 mA pentru fiecare placă de gel de poliacrilamidă, timp de 90 - 120

minute. Se recomandă ca electroforeza să se efectueze la o temperatură sub 10°C.

D) EVIDENȚIEREA ȘI FIXAREA IZOENZIMELOR LDH. După efectuarea electroforezei, gelul de poliacrilamidă se imersează în soluția de colorant și se incubează la întuneric și la 37°C, timp de aproximativ 15 – 30 minute.

După incubare, izoenzimele LDH apar sub forma a cinci benzi colorate violet care au intensități diferite de culoare, în funcție de activitatea catalitică a fiecărei izoenzime.

Gelul de poliacrilamidă pe care s-au relevat izoenzimele LDH se introduce într-o soluție de fixare compusă din 75 ml etanol, 5 ml acid acetic glacial și 20 ml apă distilată. Timpul de fixare variază între 3 – 24 ore.

Evaluarea cantitativă. Izoenzimele LDH evidențiate electroforetic se pot evalua cantitativ prin două procedee:

- *prin densitometrie*, utilizându-se aparate de înregistrare automată (densitometre); din curbele de integrare obținute se determină procentual activitatea fiecărei izoenzime a LDH;
- *prin eluție și estimare fotometrică*, după decuparea de pe gel a fiecărei benzi colorate (izoenzime); calculul procentual pentru fiecare izoenzimă se efectuează în mod identic ca la evaluarea fracțiunilor proteice obținute cu ajutorul electroforezei pe hârtie [2].

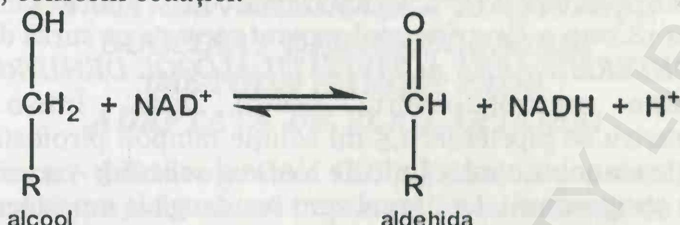
E) INTERPRETARE. Formele moleculare multiple sau izoenzimele LDH prezintă spectre electroforetice caracteristice fiecărui organ din care provin, reflectând profilul metabolic al acestuia. În țesuturile cu metabolism oxidativ (creier, inimă, rinichi) predomină izoenzimele LDH_1 și LDH_2. În țesuturile cu metabolism glicolitic (anaerob) accentuat (mușchi scheletic) predomină izoenzimele LDH_5 (în special) și LDH_4. În serul sanguin normal, „modelul" izoenzimelor LDH se caracterizează prin predominanța tipurilor LDH_1 și LDH_2 și constituie o rezultantă a activității izoenzimelor LDH tisulare care sunt deversate în sânge.

În diferite afecțiuni se constată modificări ale activității izoenzimelor LDH în serul sanguin. În infarctele miocardice, seruri hemolizate și anemie de tip Biermer predomină izoenzimele LDH_1 și LDH_2. În leziunile hepatice crește activitatea LDH_5. O anumită semnificație poate prezenta și raportul LDH_1/LDH_5.

Stabilirea raporturilor cantitative între izoenzimele LDH separate prin electroforeză prezintă importanță în clinică pentru precizarea unui diagnostic diferențial sau a evoluției unei afecțiuni.

I.3.2.5. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ALCOOL DEHIDROGENAZEI

Alcool dehidrogenaza (alcool: NAD – oxidoreductaza, EC 1.1.1.1) catalizează reacția reversibilă de oxidare a alcoolilor și de reducere a aldehidelor, conform ecuației:



Alcool dehidrogenaza aparține la clasa oxidoreductazelor și este larg răspândită în natura vie.

Enzima din drojdii are o specificitate mai pronunțată pentru acetaldehidă și alcoolul etilic (etanol), proprietate ce se corelează cu funcția ei specifică, anume participarea în procesul de fermentație alcoolică. Spre deosebire de enzima din drojdii, alcool dehidrogenaza țesuturilor animale este activă în egală măsură și față de alți alcooli. Una din funcțiile fiziologice ale alcool dehidrogenazei din ficat (unde este foarte activă), probabil, constă în metabolizarea diferiților alcooli care pot să rezulte în intestin datorită activității bacteriilor.

Principiul metodei. Metoda se bazează pe reacția de oxidare a alcoolului etilic, cuplată cu reducerea NAD^+, cantitatea NADH determinându-se spectrofotometric, prin urmărirea creșterii extincției amestecului de reacție la 340 nm. O unitate de alcool dehidrogenază (1 U_{ADH}) reduce un micromol de NAD^+ într-un minut la 25°C, în condiții definite.

Reactivi. *1) Soluție de fosfat disodic 0,066 M.* Se dizolvă 2,3644 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) în 100 ml apă bidistilată, la balon cotat.

2) Soluție tampon pirofosfat de sodiu 0,1 M, pH 9,2. Se dizolvă 11,1525 g pirofosfat de sodiu ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$) în 100 - 150 ml apă bidistilată. Se stabilește pH-ul soluției la 9,2 cu ajutorul unei soluții de HCl 1N și se completează volumul la 250 ml cu apă bidistilată. Reactivul este stabil în decurs de o lună la frigider.

3) Soluție de etanol 2 M. Un volum de 12,12 ml etanol 96% se pipetează într-un balon cotat de 100 ml și se aduce la semn cu apă bidistilată.

4) Soluție tamponată de NAD^+ 0,025 M. O cantitate de 0,16585 mg de NAD^+ se dizolvă în 10 ml soluție tampon 2.

5) Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M cu pH 7,5.

Modul de lucru. *A) EXTRACȚIA ALCOOL DEHIDROGENAZEI DIN FICAT.* Se omogenizează 0,2 g de ficat prelevat proaspăt (se poate utiliza și ficatul congelat) cu 5 ml de apă bidistilată rece și se lasă 60

minute la 4°C pentru extracţie, agitând periodic. Apoi, se centrifughează la 6.000 rotaţii/minut, timp de 15 minute, la rece. Supernatantul separat serveşte ca sursă de enzimă.

B) EXTRACŢIA ALCOOL DEHIDROGENAZEI DIN DROJDIE. 1 g de drojdie proaspătă se mojarează cu 10 ml soluţie de fosfat disodic 0,066 M, în prezenţă de sticlă pisată. Omogenatul obţinut se introduce pentru 2 ore în apă termostatată la 37°C, agitând periodic şi apoi se centrifughează 30 minute la 18.000 g. Centrifugatul separat serveşte ca sursă de enzimă.

C) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII ALCOOL DEHIDROGENAZEI. Se pregăteşte spectrofotometrul pentru lucru. Într-o cuvă de spectrofotometru se pipetează: 1,5 ml soluţie tampon pirofosfat de sodiu; 0,5 ml soluţie etanol; 1,0 ml soluţie de NAD^+ şi se lasă 3 – 4 minute pentru echilibrarea temperaturii. La timpul zero se adaugă la amestecul de reacţie 0,1 ml soluţie de alcool dehidrogenază. Se amestecă cu o baghetă de sticlă subţire şi se măsoară creşterea extincţiei (densităţii optice) la 340 nm, la 15 secunde (s), 30 s, 45 s, 60 s, 120 s, 180 s şi 240 s de reacţie, faţă de un martor constituit din 1,5 ml soluţie tampon de pirofosfat de sodiu, 1,5 ml apă bidistilată şi 0,1 ml extract de alcool dehidrogenază.

În cazul unor valori ale extincţiei peste 1,0, extractul de alcool dehidrogenază se va dilua cu soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,1 M şi pH 7,5.

Calculul rezultatelor. Se reprezintă grafic variaţia densităţii optice (D.O.) la 340 nm (ordonată) în funcţie de timp (abscisă). Se determină porţiunea din curbă în care viteza de reacţie creşte proporţională în timp. Se calculează Δ D.O. 340/minut din porţiunea lineară iniţială a curbei. Numărul unităţilor de ADH/ml extract enzimatic se calculează cu formula:

$$U_{ADH} / \text{ ml} = \Delta D.O._{340} / \text{ min}: 6,22 ,$$

unde $6,22 \times 10^6$ cm^2/ml este coeficientul de extincţie al NADH la 340 nm.

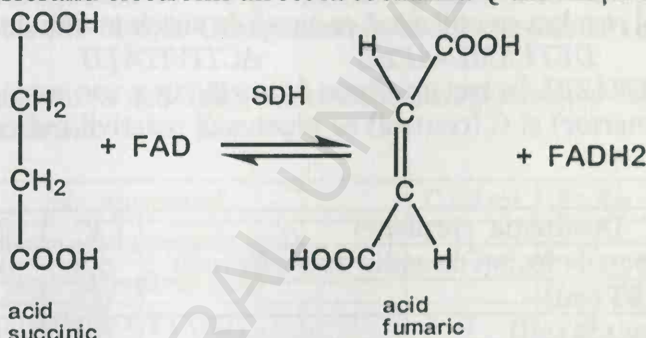
Activitatea ADH se exprimă în unităţi/g ţesut hepatic sau celule de drojdie. Pentru mai mare precizie se recomandă să se calculeze activitatea specifică a ADH prin împărţirea unităţilor/ml la mg proteină/ml:

U_{ADH} / mg proteină = $\Delta D.O._{340}$ / min: 6,22 x mg proteină / ml amestec de reacţie.

I.3.3. ENZIME PARTICIPANTE LA OXIDAREA BIOLOGICĂ A SUBSTRATELOR ORGANICE

I.3.3.1. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII SUCCINAT DEHIDROGENAZEI (METODA HARISH PADH ADAPTATĂ DE VLAD ARTENIE)

Succinat dehidrogenaza (EC 1.3.99.1) este o enzimă flavinică (flavoproteină) care joacă un rol important în mecanismul de transport al electronilor şi producerea de energie la nivel celular. Din punct de vedere structural succinat dehidrogenaza conţine 4 atomi de fier neheminic şi flavin adenin dinucleotidul (FAD) ca grupare prostetică. În celulele aerobe succinat dehidrogenaza **(SDH)** catalizează oxidarea acidului succinic (intermediar al ciclului acizilor tricarboxilici şi ciclului glioxilatului) la acid fumaric transferând electronii direct la coenzima Q din lanţul respirator:



În celule vii SDH se găseşte fixată în membrana mitocondrială internă. Enzima este larg răspândită în plante, animale şi microorganisme. Activitatea SDH în organismul uman se modifică în bolile Menkes şi Wilson , în tratamentul cu β-blocanţi a hipertensiunii, în carcinomul de colon, precum şi în unele afecţiuni neuromusculare severe.

Principiul metodei. Hidrogenul scindat de la acidul succinic sub acţiunea SDH poate reduce nitro blue tetrazolium (NBT) la un formazan de culoare albastră care se poate estima spectrofotometric la 630 nm.

Reactivi. *1) Soluţie tampon Tris-HCl 10 mM cu pH 7,2 conţinând 250 mM zaharoză şi 1 mM EDTA*. Într-un balon cotat de 100 ml se dizolvă 0,1211 g Tris, 8,5575 g zaharoză şi 0,03722 g EDTA disodic în 50 ml apă bidistilată. Se aduce pH-ul soluţiei la 7,4 cu soluţie de HCl 1 N şi se completează la 100 ml. Se păstrează la rece.

2) Soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 200 mM cu pH 7,4. Se dizolvă 29,01177 g de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ şi 2,6222 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ în 400 ml de

apă bidistilată. După ce se corectează pH-ul soluţiei la 7,4, se completează volumul soluţiei la 500 ml cu apă bidistilată. Se păstrează la 4°C.

3) Soluţie de Nitro Blue Tetrazoliu. Se dizolvă 5 mg Nitro Blue Tetrazolium (NBT) în 2 ml apă bidistilată. **Se prepară extemporaneu. Se ţine pe gheaţă!**

4) Soluţie de Triton WR 1339. Se dizolvă 0,1 g Triton WR 1339 (tyloxapol) în 10 ml apă bidistilată. Se conservă la 4°C.

5) Soluţie de succinat de sodiu 100 mM cu pH 7,4. Se dizolvă 2,701 g de succinat de sodiu ($C_4H_4O_4Na_2 \cdot 6H_2O$) în 80 ml apă bidistilată şi se adjustează pH-ul soluţiei la 7,4. Se completează la 100 ml cu apă bidistilată. Se conservă la -20°C.

6) Soluţie de sodiu dodecil sulfat (SDS) 2 %. Se dizolvă 2 g de SDS în 100 ml apă distilată. Se păstrează la temperatura camerei.

Modul de lucru. *A) PREPARAREA OMOGENATULUI TISULAR.* Se omogenizează 1 g de ţesut (ficat, creier sau muşchi) prelevat de la un animal de laborator şi se omogenizează într-un omogenizator de sticlă Potter-Elvehjem cu 10 ml soluţie Tris-HCl 10 mM cu pH 7,2 conţinând zaharoză şi EDTA. Omogenizarea se efectuează la rece timp de 1 minut. Omogenatul obţinut se centrifughează la 600 g pentru 10 minute şi supernatantul rezultat se utilizează ca sursă de succinat dehidrogenază.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII SUCCINAT DEHIDROGENAZEI. În trei eprubete de sticlă (13 x 100 mm), notate cu P (probă), M (martor) şi C (control) se pipetează reactivii indicaţi în tabelul următor:

Destinaţia eprubetei	P	M	C
Soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 200 mM (ml)	0,2	0,3	0,7
Soluţie de NBT (ml)	0,1	-	0,1
Soluţie Triton 1 % (ml)	0,1	0,1	0,1
Soluţie de succinat de sodiu 100 mM (ml)	0,1	0,1	0,1
Supernatant enzimatic (ml)	0,5	0,5	-

Eprubetele se incubează timp de 30 minute la 37°C. Acţiunea SDH se întrerupe prin adăugarea în fiecare eprubetă a câte 2,0 ml soluţie de SDS 2 %.

După adăugarea soluţiei de SDS, conţinutul eprubetelor se agită şi se citeşte extincţia probei (P) şi martorului (M) la 630 nm la un spectrofotometru pus la zero cu soluţia din control (C). Diferenţa dintre extincţia probei şi martorului reflectă viteza de oxidare a acidului succinic de către SDH din supernatantul obţinut prin centrifugarea omogenatului hepatic.

I.3.3.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII DEHIDROGENAZEI ACIDULUI SUCCINIC (METODA CU TRIFENILTETRAZOLIU)

Principiul metodei. Hidrogenul scindat de la acidul succinic sub acțiunea SDH reduce clorura de 2,3,5-trifeniltetrazoliu (CTT) în trifenilformazan de culoare roșie. Aceasta se poate estima prin măsurare la spectrofotometru după extracția trifenilformazanului cu acetonă.

Reactivi. *1) Soluție tampon fosfat 0,1M cu pH=6,8.* Se amestecă 51 ml soluție NaH_2PO_4 0,2M cu 49 ml soluție Na_2HPO_4 0,2M și se diluează la 200 ml.

2) Soluție stoc de acid succinic, 1 mg/1 ml.

3) Soluție de lucru de acid succinic, 250 µg/ ml.

4) Soluție de 2,3,5-trifeniltetrazoliu 0,5% în soluție tampon fosfați (reactivul 1).

5) Acetonă.

Mod de lucru. Pentru obținerea preparatului de succinatdehidrogenază, se omogenizează 1 g ficat în 10 ml soluție tampon fosfat 0,1M cu pH-ul 6,8. Omogenizarea se efectuează la rece timp de 1 minut.

Determinarea activității succinatdehidrogenazei se realizează după următoarea schemă:

Nr. eprubetei	Control	Proba	Martor
Soluție acid succinic (ml)	1	1	-
Apă bidistilată (ml)	-	-	1
Soluție CTT (ml)	1	1	1
Omogenat hepatic (ml)	-	0,1 - 1	0,1 - 1
Soluție tampon fosfat (ml)	1	-	-

Eprubetele se incubează timp de 30 minute la 37°C.

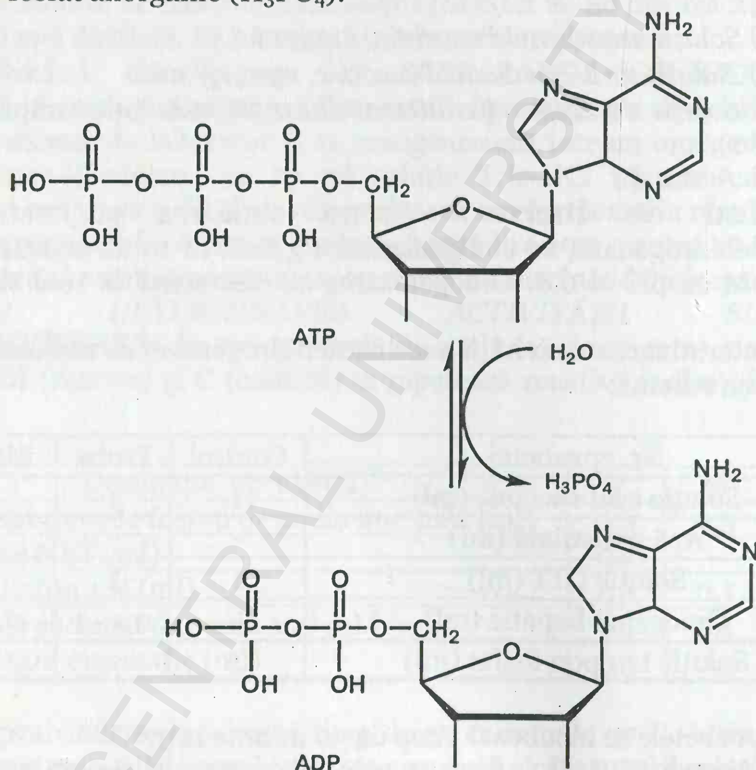
Acțiunea SDH se întrerupe prin adăugarea în fiecare eprubetă a câte 2,5 ml acetonă care precipită proteinele și dizolvă trifenilformazanul format. După adăugarea acetonei, conținutul eprubetelor se agită și se răcește ***<u>într-o baie cu gheață</u>*** timp de 10-15 min.

Apoi conținutul eprubetelor se filtrează și se vor citi la spectrofotometru la 540 nm. Valorile extincțiilor reflectă viteza de oxidare a acidului succinic de către SDH din omogenatul hepatic.

I.3.4. ENZIME IMPLICATE ÎN ETAPA FINALĂ A OXIDĂRII BIOLOGICE

I.3.4.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ADENOZINTRIFOSFATAZEI

Adenozintrifosfataza (ATP-fosfohidrolaza sau ATP-aza, E.C. 3.6.1.3) catalizează hidroliza legăturii γ-fosfat-macroergice din molecula acidului adenozintrifosforic (ATP), conducând la acid adenozindifosforic (ADP) şi fosfat anorganic (H_3PO_4):



În organismele animale şi vegetale există mai multe tipuri de ATP-aze care îndeplinesc importante roluri biologice în diverse procese celulare. Toate ATP-azele reprezintă enzime cu structuri complexe. În mitocondrii, centrele energetice ale celulei, sunt localizate ATP-aze implicate în sinteza şi hidroliza ATP. În celulele vii, de asemenea, există ATP-aze care participă la transportul cationilor de calciu, magneziu, potasiu, sodiu şi ionilor de hidrogen.

I.3.4.1.1. Determinarea activității ATP-azei în țesuturile animale

Principiul metodei. Metoda se bazează pe măsurarea cantității de fosfor anorganic rezultat prin scindarea hidrolitică a ATP sub acțiunea ATP-azei existente în omogenatul celular obținut din țesutul de analizat. Pentru a determina activitatea Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+} - ATP - azei se va lucra în prezența ionilor respectivi, pentru determinarea activității Mg^{2+} - ATP - azei se va lucra în prezența ionului Mg^{2+}, iar activitatea Na^{+}, K^{+} - ATP - azei se va determina prin diferență.

Reactivi. *1) Soluție tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH=7,4.* Se vor amesteca 250 ml soluție Tris [Tris-(hidroximetil)-amino-metan] 0,2 M cu 425 ml soluție de HCl 0,1 N și după corectarea pH-ului soluției la 7,4 se va completa volumul la 1000 ml cu apă bidistilată.

2) Soluție de zaharoză 0,25 M și EDTA 0,003 M în soluție tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH=7,4. Se dizolvă 8,5575 g de zaharoză (sucroză) și 0,11166 g de EDTA disodic în 100 ml soluție tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH 7,4, la balon cotat.

3) Soluție de ATP 20 mM în soluție tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH=7,4. Se dizolvă 0,11022 g ATP-sare disodică în 10 ml soluție tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH 7,4.

4) Soluție de $MgCl_2$ 60 mM în soluție tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH=7,4. Se dizolva 0,57144 g $MgCl_2$ (1,6674 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) în 100 ml soluție tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH 7,4.

5) Soluție de NaCl 100 mM. Se prepară dizolvând 0,5846 g clorură de sodiu în 100 ml apă bidistilată.

6) Soluție de KCl 20 mM. Se obține prin dizolvarea cantității de 0,14912 g clorură de potasiu în 100 ml apă bidistilată.

7) Soluție de acid tricloracetic (ATC) 20% sau 10%.

8) Soluție de acid sulfuric 5 N. Se adaugă cu atenție 30 ml acid sulfuric concentrat(94-96%) la 170 ml apă distilată.

9) Soluție de molibdat de amoniu 2,5% în acid sulfuric 5 N.

10) Soluție de acid ascorbic 0,4% (**se va prepara extemporaneu**).

Modul de lucru. *A) DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ATP-AZELOR.* O cantitate de 0,2 g țesut animal (mușchi, ficat, creier etc.) se mojarează (sau omogenizează) la rece timp de 5 - 10 minute cu 2 ml soluție de zaharoză 0,25 M și EDTA 0,003 M în tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH=7,4. În omogenatul rezultat se va determina activitatea ATP-azelor conform indicațiilor din tabelul următor. Se recomandă să se utilizeze eprubete de centrifugă de 10 ml.

Schema de efectuare a determinării activității ATP-azelor cu indicarea compoziției mediului de incubație.

Compoziţia mediului de incubaţie	ATP-aza			
	Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+} - dependentă		Mg^{2+} - dependentă	
	Martor	Probă	Martor	Probă
1. Soluţie tampon Tris-HCl 0,05 M, pH=7,4 (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4
2. Soluţie $MgCl_2$ (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
3. Soluţie NaCl (ml)	0,1	0,1	-	-
4. Soluţie KCl (ml)	0,1	0,1	-	-
5. Apă bidistilată (ml)	0,4	0,4	0,6	0,6
6. Omogenat tisular (ml)	-	0,2	-	0,2
7. Soluţie ATP (ml)	-	0,3	-	0,3
Incubare 30 minute la 37°C				
8. Soluţie de acid tricloracetic(ml)	0,4	0,4	0,4	0,4
9. Omogenat tisular (ml)	0,2	-	0,2	-
10. Soluţie ATP (ml)	0,3	-	0,3	-

Conţinutul eprubetelor se va filtra sau se va centrifuga timp de 15 minute la 4000 rot./min. şi în filtratul (supernatantul) limpede se va doza fosforul anorganic.

B) DOZAREA FOSFORULUI ANORGANIC. În eprubete separate (de 16/160 mm) se vor pipeta între 0,1 - 1 ml de filtrat corespunzător pentru fiecare probă şi fiecare martor. Se adaugă apoi câte 2 ml soluţie de molibdat de amoniu 2,5% şi câte 1 ml de soluţie de acid ascorbic 0,4%. Volumul se va completa la 10 ml cu apă bidistilată. Conţinutul eprubetelor se va agita şi după 30 minute se va citi extincţia la spectrofotometru la lungimea de undă de 700 nm faţă de un control al reactivilor realizat prin amestecarea a 2 ml soluţie de molibdat de amoniu 2,5% cu 1 ml soluţie de acid ascorbic 0,4% şi completat la 10 ml cu apă bidistilată.

Pentru determinarea cantităţii de fosfor anorganic din probe şi martori se va folosi o curbă de etalonare. Pentru construirea ei, într-o serie de eprubete se măsoară corespunzător 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 şi 5,0 ml dintr-o soluţie etalon de fosfat monopotasic care conţine 0,025 mg fosfor într-un ml. Se adaugă câte 2 ml soluţie de molibdat de sodiu 2,5%, câte 1 ml soluţie de acid ascorbic 0,4% şi se completează volumul fiecărui etalon la 10 ml. După 30 minute se citesc extincţiile etaloanelor la spectrofotometru la 700 nm, faţă de controlul reactivilor. Valorile extincţiilor etaloanelor se folosesc pentru construirea curbei etalon.

Calculul rezultatelor. Activitatea ATP-azei se exprimă în micromoli de ATP scindaţi în timp de un minut, de enzima dintr-un gram de ţesut animal.

Calculul activităţii ATP-azei se face după formula:

$$activitatea = (a_{cer} - a_m) \times \frac{2}{v} \times \frac{2}{0{,}2} \times \frac{1}{0{,}2} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{0{,}031}$$

unde: a_{cer} - cantitatea de fosfor anorganic, în mg, determinată din curba etalon, corespunzând probei de cercetat;

a_m - cantitatea de fosfor anorganic, în mg, determinată din curba etalon corespunzând martorului;

v - volumul de mediu de incubaţie (filtrat), în ml, luat pentru dozarea fosforului anorganic;

0,031 - masa, în mg, corespunzătoare unui micromol de fosfor scindat de la un micromol de ATP sub acţiunea ATP-azei.

I.3.4.1.2. Determinarea activităţii ATP-azei în plante

Principiul metodei este acelaşi cu cel descris la determinarea activităţii ATP-azei în ţesuturile animale.

Reactivi. Reactivii 1-10 de la determinarea activităţii ATP-azei în ţesuturile animale (Vezi *Lucrarea I.3.8.1.1*).

Modul de lucru. *A) EXTRACŢIA ATP-AZEI.* Se mojarează 1g material vegetal proaspăt (frunze, embrioni etc.) cu nisip de cuarţ sau sticlă pisată, într-un mojar răcit. După 5 minute de mojarare (obţinerea unei mase uniforme) se adaugă 4 ml soluţie de zaharoză 0,25 M şi EDTA 0,003 M în soluţie tampon Tris-HCl 0,05 M cu pH 7,4 şi se continuă operaţia de omogenizare încă 5 minute. Omogenatul se centrifughează la rece (0 - 4°C), timp de 15 minute, la 4000 rot./min.. Reziduul se suspendă în 2 ml soluţie de zaharoză şi EDTA în tampon Tris-HCl şi se centrifughează în aceleaşi condiţii. Supernatantele de la prima şi a doua centrifugare se unesc, folosindu-se ca sursă de ATP-ază.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII ATP-AZEI. Mediul de incubaţie este alcătuit din componenţii indicaţi în tabelul următor. Componenţii mediului de reacţie se vor măsura în eprubete de centrifugă de 10 ml.

Compoziţia mediului de incubaţie şi schema de determinare a activităţii ATP-azei vegetale

Componenţii mediului de incubaţie	ATP-aza			
	Mg^{2+},Na^{+},K^{+}		Mg^{2+}	
	Martor	Probă	Martor	Probă
1.Soluţie Tris-HCl 0,05M, pH 7,4 (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4
2.Soluţie $MgCl_2$ (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
3.Soluţie NaCl (ml)	0,1	0,1	-	-
4.Soluţie KCl (ml)	0,1	0,1	-	-
5. Apă bidistilată (ml)	-	-	0,2	0,2

Componenţii mediului de incubaţie	ATP-aza			
	Mg^{2+},Na^{+},K^{+}		Mg^{2+}	
	Martor	Probă	Martor	Probă
6.Supernatant (ml)	0,6	0,6	0,6	0,6
7.Soluţie ATP (ml)	-	0,3	-	0,3
Incubaţie 30	minute	la	30°C	
9.Soluţie TCA (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4
10.Soluţie ATP (ml)	0,3	-	0,3	-

După adăugarea soluţiei de acid tricloracetic atât martorii cât şi probele se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot./min. Din fiecare supernatant se ia câte 0,1 – 1,0 ml pentru determinarea fosforului anorganic după metoda descrisă la *Lucrarea I.3.8.1.1.*

Calculul rezultatelor. Prin extrapolarea extincţiilor pe curba etalon se obţine concentraţia fosforului anorganic în mg, în probe şi martori.

Activitatea ATP-azei (A) se exprimă în micromoli de fosfor anorganic formaţi de enzima dintr-un gram de material vegetal în timp de 1 minut, calculându-se cu ajutorul formulei:

$$A = (a_{cer} - a_{mar}) \times \frac{2}{V} \times \frac{6}{0,6} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{0,031}$$, unde:

a_{cer} – cantitatea de fosfor anorganic, în mg, în probă;

a_{mar} – cantitatea de fosfor anorganic, în mg, corespunzătoare extincţiei martorului;

0,031 – masa în mg a unui micromol de fosfor scindat de la un micromol de ATP sub acţiunea ATP-azei.

Pentru mai mare exactitate, rezultatele, de asemenea, se pot raporta la mg de proteină.

I.3.4.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII CATALAZEI

Catalaza (H_2O_2: H_2O_2 – oxidoreductaza, EC 1.11.1.6) este o enzimă antioxidantă, răspândită în organismele aerobe. Alături de peroxidaza (EC 1.11.1.7) și glutation peroxidază (EC 1.11.1.9), catalaza este implicată în detoxifierea peroxidului de hidrogen (H_2O_2), o specie reactivă de oxigen (ROS), care se formează atât în metabolismul normal cât și în numeroase stări patologice, sub acțiunea diferitelor oxidaze și a superoxid dismutazei. Peroxidul de hidrogen este un produs toxic a cărui acumulare în celula vie poate cauza oxidarea unor compuși chimici celulari ca ADN, proteinele și lipidele conducând la mutageneză sau moartea celulei.

Rolul biologic al catalazei în celula vie constă în descompunerea apei oxigenate conform reacției:



$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Acțiunea catalazei se corelează cu mersul multor reacții biochimice implicate în metabolismul glucidelor, lipidelor, aminoacizilor, proteinelor și altor substanțe. Aceasta explică răspândirea largă a catalazei în organismele animale, plante și microorganismele aerobe.

Activitatea catalazei poate fi determinată prin metode manometrice, titrimetrice, spectrofotometrice etc.

I.3.4.2.1. Determinarea activității catalazei în sânge (metoda Bach-Zubkova)

Principiul metodei. Metoda Bach-Zubkova se bazează pe dozarea apei oxigenate rămasă nedescompusă, după întreruperea acțiunii catalazei. Dozarea apei oxigenate din probă și din martor se face prin titrare cu permanganat de potasiu în mediu acid:



$$5H_2O_2 + 2KMnO_4 + 3H_2SO_4 \longrightarrow 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 8H_2O + 5O_2$$

Activitatea catalazei se apreciază după diferența dintre cantitatea de permanganat utilizată la dozarea apei oxigenate în martor și probă.

Reactivi. *1) Soluție de apă oxigenată 1%.* Se diluează 0,833 ml apă oxigenată concentrată (30%) cu apă bidistilată la 25 ml.

2) Soluție de acid sulfuric 10% (vezi Reactiv 5, *Lucrarea I.3.8.2.2*).

3) Soluție de permanganat de potasiu 0,1 N. Se dizolvă 3,30 g de permanganat de potasiu în 1000 ml apă distilată. Soluția obținută se transvazează într-un flacon de sticlă brună, închis bine cu dop rodat și se lasă 7-8 zile la întuneric la temperatura camerei. Apoi se determină factorul soluției de permanganat cu ajutorul acidului oxalic.

Modul de lucru. Într-un balon cotat de 100 ml se introduc aproximativ 50 ml de apă bidistilată și se adaugă cu ajutorul unei micropipete 0,1 ml sânge proaspăt recoltat. Micropipeta se spală de câteva ori cu soluție din balon prin aspirare și expulzare Conținutul balonului se amestecă pentru a se produce hemoliza totală și se completează cu atenție la semn cu apă bidistilată. Se obține o soluție de sânge cu diluția de 1:1000.

În două flacoane conice se măsoară câte 10 ml apă bidistilată şi câte 1 ml de sânge diluat. Conţinutul unui flacon (martor) se fierbe 3-5 minute pentru a inactiva catalaza, care este o enzimă termolabilă. După fierbere, flaconul se răceşte. Apoi se adaugă în fiecare flacon câte 2 ml soluţie de apă oxigenată 1% şi se agită. Ambele flacoane se lasă în repaus pentru 30 minute la temperatura camerei. După trecerea acestui timp se introduc în fiecare flacon câte 5 ml soluţie acid sulfuric 10% pentru blocarea reacţiei de descompunere a apei oxigenate declanşată de catalază. Apa oxigenată în martor şi cea rămasă nedescompusă în probă se titrează cu soluţie de permanganat de potasiu până la apariţia unei coloraţii slab roz. Dacă în timpul titrării se formează prea multă spumă, atunci în flacoane se adaugă câte o picătură de alcool amilic.

Calculul rezultatelor. Pentru titrarea apei oxigenate în martor s-au consumat n_1 ml soluţie de permanganat, iar pentru titrarea apei oxigenate care a rămas nedescompusă în proba cu catalază activă, s-au consumat n_2 ml soluţie de permanganat.

Calcularea rezultatelor se efectuează ţinându-se seama de faptul ca 1 ml soluţie de permanganat de potasiu N/10 este echivalent cu 1 ml soluţie de apă oxigenată N/10. Diferenţa $n_1 - n_2$ reprezintă numărul mililitrilor de apă oxigenată N/10 descompusă de catalaza sanguină. Un ml soluţie de apă oxigenată N/10 conţine 1,7 mg de apă oxigenată.

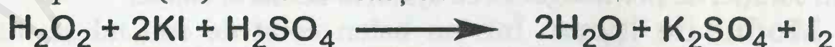
Înmulţind numărul mililitrilor de apă oxigenată descompusă cu 1,7 se obţine cantitatea de apă oxigenată, exprimată în mg, descompusă în timp de 30 minute de catalaza din 0,001 ml sânge, adică aşa numita cifră catalazică.

Valori normale. În sângele uman, cifra catalazică variază între 12 şi 20. La mamifere catalaza se găseşte exclusiv în eritrocite, fiind absentă în plasmă şi serul sanguin.

Variaţii patologice. Activitatea catalazei în sânge se modifică în organele atinse de procese tumorale, în unele afecţiuni ale ficatului, în bolile de iradiere.

I.3.4.2.2. Determinarea activităţii catalazei în plante prin titrare iodometrică (metoda J. B. Sumner şi G. F. Somers, modificată de Vlad Artenie)

Principiul metodei. Apa oxigenată (H_2O_2) rămasă nedescompusă după un anumit timp de incubaţie cu catalaza, oxidează iodura de potasiu (KI) conform reacţiei:



$$H_2O_2 + 2KI + H_2SO_4 \longrightarrow 2H_2O + K_2SO_4 + I_2$$

Iodul (I_2) pus în libertate este titrat cu o soluţie de tiosulfat de sodiu de concentraţie cunoscută, în prezenţa amidonului ca indicator:



$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

În paralel cu proba se realizează şi un martor cu enzimă inactivă de la începutul incubaţiei. Diferenţa între numărul ml de tiosulfat de sodiu

consumat la titrarea apei oxigenate în martor şi numărul ml de tiosulfat consumat la titrarea apei oxigenate rămasă nedescompusă în probă reflectă activitatea catalazei din materialul cercetat.

Reactivi: *1) Soluţie de fosfat disodic 0,1M.* O cantitate de 17,9085 g fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) se dizolvă în 500 ml apă bidistilată, la balon cotat.

2) Soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,2 M cu pH-ul 7. Se dizolvă 2,67125 g fosfat monosodic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) şi 10,92625 g fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) în 150 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 250 ml. După verificarea şi eventual corectarea pH-ului la 7 se aduce volumul soluţiei la 250 ml cu apă bidistilată.

3) Soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,05 M cu pH-ul 7. Se prepară prin amestecarea a 100 ml soluţie tampon de fosfaţi 0,2 M cu pH =7 şi 300 ml apă bidistilată.

4) Soluţie de apă oxigenată 3%. Se diluează 2,5 ml apă oxigenată (perhidrol) concentrată (30%) cu apă bidistilată la 25 ml într-un balon cotat.

5) Soluţie de acid sulfuric 10%. La 450 ml apă distilată se adaugă , în cantităţi mici şi sub agitare, 50 ml de acid sulfuric concentrat.

6) Soluţie de iodură de potasiu 15%.

7) Soluţie de molibdat de amoniu 1%.

8) Soluţie de amidon 1% (vezi Reactiv 3, *Lucrarea I.1.1*).

9) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N. Se dizolvă 25 g de tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) în 1000 ml apă distilată (în prealabil fiartă şi răcită pentru îndepărtarea dioxidului de carbon), la balon cotat.

10) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,02N. Într-un balon cotat de 1000 ml se amestecă 200 ml soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N cu 800 ml apă distilată fiartă. Se stabileşte factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu obţinută cu ajutorul unei soluţii de dicromat de potasiu 0,02 N.

Modul de lucru. *A) EXTRACŢIA CATALAZEI.* O cantitate de 0,1-0,5 g de material vegetal fin omogenizat se extrage cu 5 ml soluţie de fosfat disodic 0,1M, într-o eprubetă de centrifugă, timp de 60 minute agitând din 10 în 10 minute cu ajutorul unei baghete de sticlă. Conţinutul eprubetei se centrifughează timp de 15 minute, la 3000 rotaţii/minut. Supernatantul separat serveşte drept sursă de enzimă.

Dacă materialul cercetat nu pot fi măcinat, de asemenea în cazul seminţelor supuse germinării, frunzelor, tuberculilor, fructelor, se ia o anumită cantitate (0,1 – 1 g), în funcţie de activitatea presupusă a catalazei, se mojarează la rece cu nisip de cuarţ sau sticlă pisată. Apoi, masa obţinută se transferă cantitativ cu 5 ml soluţie de fosfat disodic 0,1 M într-o eprubetă de centrifugă, după care se continuă extracţia ca mai sus. Pentru îndepărtarea pigmenţilor din extractul enzimatic, aceasta se congelează la –5°C timp de 18 ore şi se centrifughează. Supernatantul se supune dializei în soluţie tampon fosfat 0,05 M cu pH-ul 7, timp de 2 ore şi la 4°C.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII CATALAZEI ÎN EXTRACT. În două flacoane conice cu gâtul larg de 100 ml se măsoară câte 6 ml soluţie

tampon de fosfaţi de sodiu 0,05 M cu pH 7. În cel de al doilea flacon care va reprezenta proba se pipetează câte 0,1 – 2 ml extract enzimatic, iar în primul flacon care va servi drept martor se introduce acelaşi volum de apă distilată, echivalent cu cel de extract enzimatic luat în lucru. În ambele flacoane se adaugă câte 0,2 ml soluţie de apă oxigenată 3%. După agitarea conţinutului, flacoanele se lasă în repaus la temperatura de 20°C exact 5 minute din momentul pipetării apei oxigenate.

Acţiunea catalazei asupra apei oxigenate se întrerupe prin introducerea în fiecare flacon a câte 5 ml soluţie de acid sulfuric 10%. Pe urmă se adaugă câte 5 ml soluţie de KI 15% şi o picătură din soluţia de molibdat de amoniu 1%. Conţinutul flacoanelor se agită cu atenţie.

Iodul eliberat, în urma reacţiei dintre apa oxigenată nedescompusă enzimatic şi iodura de potasiu, se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,02 N până la culoarea galben-pai. În acest moment se adaugă 2-3 picături de soluţie de amidon 1% şi se continuă titrarea până când culoarea apărută la adăugarea amidonului dispare complet.

Cantitatea de apă oxigenată descompusă sub acţiunea catalazei se află după diferenţa între rezultatele titrării martorului şi probei.

Calculul rezultatelor. Ca unitate de activitate a catalazei se consideră acea cantitate de enzimă care descompune într-un minut un micromol de apă oxigenată (0,034 mg).

Întrucât la 1 ml soluţie de tiosulfat de sodiu 0,02 N corespund 0,34 mg apă oxigenată, rezultă că la numărul de ml soluţie de tiosulfat reprezentând diferenţa dintre titrarea martorului (V) şi probei (v) vor corespunde X mg H_2O_2:

$$X = (V - v).\ F.\ 0{,}34, \text{ unde:}$$

V- numărul ml de soluţie de tiosulfat de sodiu consumat la titrarea martorului;

v - numărul ml de soluţie de tiosulfat de sodiu consumat la titrarea probei;

F- factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu.

Cantitatea de apă oxigenată descompusă în timp de 1 minut de catalaza dintr-un gram de material vegetal se calculează cu ajutorul formulei:

$$X_1 = \frac{(V - v).\ F.\ 0{,}34.\ 5}{5.\ p.n}$$, unde:

p - greutatea materialului biologic, luat pentru analiză, în grame şi

n – ml de extract enzimatic luaţi pentru determinare.

Dacă o unitate catalazică descompune un micromol de apă oxigenată într-un minut, adică 0,034 mg H_2O_2/min., atunci A unităţi catalazice vor scinda X_1 mg H_2O_2/min., de unde rezultă că numărul de unităţi catalazice / min./ g (UC /min./ g) se calculează cu formula:

$$A = \frac{X_1}{0{,}034} = \frac{(V - v).\ F.\ 0{,}34.\ 5}{5.\ p.\ n.\ 0{,}034} = \frac{(V - v).\ F}{p.\ n} \cdot 10$$

OBSERVAȚIE. Pentru exactitatea rezultatelor se recomandă ca v să fie apropiat de jumătatea valorii lui V. Dacă v este mai mic de 3 ml soluție de tiosulfat de sodiu se va lua un volum mai mic de extract enzimatic sau acesta se va dilua în mod corespunzător.

I.3.4.2.3. Determinarea spectrofotometrică a activității catalazei (metoda Sinha)

Principiul metodei. Catalaza este lăsată să acționeze asupra apei oxigenate o perioadă fixă de timp, după care enzima este inactivată prin adăugarea unui amestec de bicromat de potasiu-acid acetic. Cantitatea de apă oxigenată, rămasă nedescompusă după stoparea acțiunii catalazei, reduce în mediul acid bicromatul de potasiu la acetat cromic, care poate fi determinat spectrofotometric la 570 nm. Deoarece bicromatul de potasiu nu absoarbe la această lungime de undă, prezența lui în mediul de reacție nu interferează cu determinarea spectrofotometrică a acetatului cromic.

Făcând diferența între cantitatea inițială și cea finală de apă oxigenată în mediul de reacție, se află cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalază.

Reactivi. *1) Soluție de bicromat de potasiu 5 %.* Se dizolvă 5 g de bicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$) în 100 ml apă distilată, la balon cotat.

2) Soluție bicromat de potasiu-acid acetic glacial. Se amestecă 20 ml soluție de bicromat de potasiu 5 % cu 60 ml acid acetic glacial.

3) Soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH 7,0. Se dizolvă 0,2654 g KH_2PO_4 și 0,5312 g K_2HPO_4 în 300 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 500 ml. Se corectează pH-ul la 7,0 și se completează la 500 ml cu apă bidistilată.

4) Soluție substrat de apă oxigenată 0,16 M în soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH 7. Se diluează 1,8133 ml apă oxigenată concentrată (30 %) cu soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M la 100 ml într-un balon cotat.

5) Soluție etalon de apă oxigenată 0,08 M în soluție tampon de fosfați de potasiu 0,01 M cu pH 7. Într-un balon cotat de 100 ml se pipetează 0,907 ml de apă oxigenată concentrată (30 %) și se completează la semn cu soluție tampon de fosfați de potasiu (Reactiv 3).

6) Soluție de fosfat disodic 0,1 M (vezi Reactiv 1, *Lucrarea I.3.8.2.2*).

Modul de lucru. *A) EXTRACȚIA CATALAZEI.* O cantitate de 0,1 – 1 g de țesut animal sau vegetal se omogenizează cu sticlă pisată sau nisip de curaț și 5 ml de soluție de fosfat disodic 0,1 M. După 30 minute de extracție, omogenatul se centrifughează la 4000 rot./min., timp de 15 minute. Supernatantul separat servește ca sursă de catalază.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂȚII CATALAZEI. În trei eprubete termorezistente – două probe și un martor - se pipetează reactivii indicați în tabelul următor:

Specificaţie	Probă	Martor
Preparat catalazic (supernatant) , ml	0,1	-
Soluţie tampon fosfaţi de potasiu, ml	0,4	0,4
Soluţie substrat de apă oxigenată, ml	0,5	0,5

După exact (!!) 60 secunde de la pipetarea soluţiei substrat de apă oxigenată se stopează reacţia în una din probe şi după 120 secunde în cealaltă probă, prin adăugarea a câte 2 ml de soluţie bicromat de potasiu-acid acetic (reactiv 2). În martor se pipetează 2 ml soluţie de bicromat de potasiu-acid acetic (reactiv 2) şi 0,1 ml preparat catalazic.

Toate eprubetele se introduc în baie de apă la fierbere, timp de 10 minute. Apoi eprubetele se răcesc sub jet de apă şi se citesc extincţiile lor la 570 nm, faţă de apă distilată.

Calculul rezultatelor. Activitatea catalazei se exprimă în unităţi enzimatice (UE). O unitate de catalază reprezintă cantitatea de enzimă care descompune un micromol de apă oxigenată (0,034 mg) în timp de un minut la temperatura de 20°C şi pH=7. Pentru aflarea micromolilor de apă oxigenată, se construieşte o curbă etalon cu ajutorul soluţiei etalon de apă oxigenată (80 micromoli/ml), realizând diluţii conform tabelului.

Micromoli H_2O_2 / ml	Soluţie etalon de H_2O_2 (ml)	Soluţie tampon fosfaţi de potasiu (ml)
8	0,1	0,9
16	0,2	0,8
24	0,3	0,7
32	0,4	0,6
40	0,5	0,5
48	0,6	0,4
56	0,7	0,3
64	0,8	0,2
72	0,9	0,1
80	1,0	0

În fiecare etalon se măsoară câte 2 ml soluţie bicromat de potasiu-acid acetic (reactiv 2) şi eprubetele se menţin în baie de apă la fierbere timp de 10 minute. Apoi se răcesc sub jet de apă şi se citesc extincţiile la 570 nm, faţă de apă distilată.

După aflarea micromolilor de apă oxigenată corespunzători probelor şi martorului, se calculează activitatea catalazei în micromoli de apă oxigenată descompusă într-un minut de enzima dintr-un gram de ţesut analizat sau dintr-un ml de sânge (în acest caz se va lucra cu sânge hemolizat diluat, conform indicaţiilor de la *Lucrarea I.3.8.2.1*) sau dintr-un ml de lichid de cultură.

Dacă 1 UE reprezintă 1 micromol de apă oxigenată, atunci diferența dintre numărul micromolilor de apă oxigenată din martor (**n_1** = 80 micromoli de apă oxigenată corespunzători la 0,5 ml soluție de apă oxigenată 0,16 M) și numărul de micromoli de apă oxigenată rămași nedescompuși în probă (**n_2**) după inactivarea catalazei cu soluție de bicromat de potasiu-acid acetic, ne va da X UE.

Valoarea **n_2** se poate afla din curba etalon sau din raportul extincțiilor martorului și probei: $E_M / E_P = 80 / n_2$, de unde $n_2 = E_P.80 / E_M$.

Numărul X de UE, adică numărul micromolilor de apă oxigenată descompuși în timp de un minut de catalaza dintr-un gram de țesut animal sau vegetal se calculează cu formula:

$$X = \frac{(n_1 - n_2) \cdot 5}{t \cdot 0,1 \cdot p} = \frac{(80 - n_2)}{t \cdot p} \times 50$$

, unde:

t – timpul de incubație, în minute;

p – greutatea materialului biologic, luat pentru analiză, în g.

Activitatea specifică a catalazei se calculează prin raportarea numărului de micromoli de apă oxigenată/minut la numărul mg de proteină existent în extractul enzimatic sau serul sanguin sau lichidul de cultură.

I.3.4.3. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII PEROXIDAZEI (METODA L. V. GUDKOVA ȘI R. G. DEGTIARI)

Peroxidaza (donor: peroxid de hidrogen-oxidoreductaza, EC 1.11.1.7) este o enzimă bicomponentă aparținând hemproteinelor. Ea îndeplinește un rol deosebit în procesele oxidoreducătoare corelate cu respirația plantelor și animalelor. Această enzimă catalizează oxidarea diferitelor substrate de natură chimică determinată, cu ajutorul apei oxigenate, conform reacției:



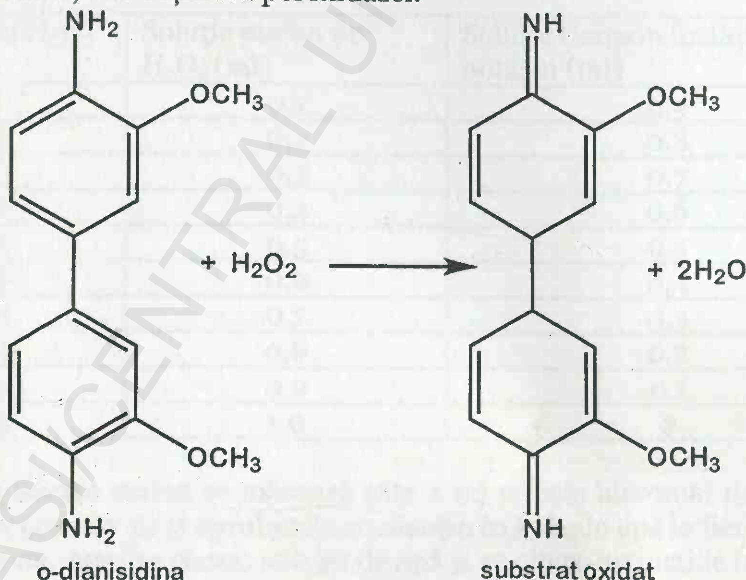
$$AH_2 + H_2O_2 \longrightarrow A + 2H_2O$$

unde AH_2 – substratul supus oxidării, iar A – substratul oxidat.

Între substratele care pot fi oxidate de peroxidază în prezența apei oxigenate, se numără următoarele:

- ✓ practic toți fenolii (pirocatehină, pirogalol, acid galic, guaiacol etc.) liberi sau legați;
- ✓ aminele aromatice (benzidină, parafenilendiamină și altele);
- ✓ substanțele ușor oxidabile, de tipul acidului ascorbic, glutationului, nitriților etc.

Principiul metodei. Metoda se bazează pe măsurarea intensității culorii produsului de oxidare a orto-dianisidinei cu ajutorul apei oxigenate, sub acțiunea peroxidazei:



Reactivi. *1) Soluție tampon TRIS-HCl 0,1 M, cu pH 7,8 conținând 1 mmol dithiothreitol și 1 mmol EDTA pentru extracția peroxidazei vegetale.* Într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 6,0568 g TRIS [Tris(hydroxymethyl)aminomethane: $C_4H_{11}NO_3$], 0,1861 g EDTA [etilendiamintetraacetat de sodiu] și 0,0759 g dithiothreitol în 300 ml apă

bidistilată. Se aduce pH-ul la 7,8 cu soluţie de acid clorhidric 1 N. Se completează la 500 ml cu apă bidistilată. Se păstrează la frigider.

2) Soluţie tampon TRIS-HCl 0,08 M cu pH 7,4 conţinând 250 mmol zaharoză, 5 mmol $MgCl_2$ şi 1 mmol EDTA disodic pentru extracţia peroxidazei din ţesuturile animale. Într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 4,844 g TRIS, 42,7725 g zaharoză, 0,50835 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ şi 0,1861 g EDTA în 300 ml apă bidistilată. Se aduce pH-ul la 7,4 cu soluţie de acid clorhidric 1 N. Se completează la 500 ml cu apă bidistilată. Se păstrează la frigider.

3) Soluţie tampon de fosfaţi de potasiu 0,4 M cu pH 5,9. Se dizolvă 21,7744 g KH_2PO_4 şi 6,9672 g K_2HPO_4 în 400 ml apă bidistilată. După ce se corectează pH-ul la 5,9, se completează la 500 ml cu apă bidistilată.

4) Soluţie de orto-dianisidină 1% în alcool etilic 96%. Se dizolvă 0,1 g de orto-dianisidină în 10 ml alcool etilic 96 %.

5) Soluţie de substrat tamponat. La 50 ml soluţie tampon de fosfaţi 0,4 M cu pH 5,9 se adaugă 2 ml soluţie alcoolică de orto-dianisidină 1% şi apă bidistilată până la 100 ml. Reactivul se conservă în sticlă brună şi la rece timp de două săptămâni.

6) Soluţie de apă oxigenată 0,05% (se prepară extemporaneu). La 30 ml apă bidistilată se adaugă 0,05 ml apă oxigenată concentrată (30%).

7) Soluţie de acid sulfuric 50%. La 250 ml apă distilată se adaugă cu atenţie, în volume mici şi sub agitare, 250 ml acid sulfuric concentrat.

Modul de lucru. *A) EXTRACŢIA PEROXIDAZEI.* Pentru obţinerea extractului enzimatic se mojarează 0,1 – 0,5 g ţesut vegetal sau animal cu aceeaşi masă de sticlă pisată sau nisip de cuarţ. Ţesutul mojarat se trece cantitativ într-o eprubetă gradată de 10 ml cu ajutorul soluţiei tampon pentru extracţie şi se completează la semn. Mojararea se execută într-o baie de gheaţă. Omogenatul obţinut se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot./min, la o centrifugă cu răcire. Supernatantul separat se foloseşte ca sursă de enzimă.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII PEROXIDAZEI. În momentul determinării activităţii peroxidazei într-o eprubetă de 20 ml se măsoară 0,1 – 0,5 ml extract enzimatic (supernatant), 3 ml soluţie de substrat tamponat (reactiv 5) şi se completează volumul cu apă bidistilată la 4,8 ml. Se adaugă 0,2 ml soluţie de apă oxigenată 0,05 % şi eprubeta se cufundă într-o baie de apă cu temperatura de 20°C, timp de exact 5 minute (!). Acţiunea peroxidazei se întrerupe prin adăugarea de 5 ml soluţie de acid sulfuric 50%. Intensitatea culorii se determină la un spectrofotometru, utilizând lungimea de undă de 540 nm şi cuva cu lărgimea de 10 mm, faţă de un martor conţinând următorii componenţi ai sistemului de reacţie, adăugaţi în ordinea: apă bidistilată (4,7 – 4,3 ml) , soluţie de acid sulfuric 50% (5 ml), extract enzimatic (0,1 – 0,5 ml) şi soluţie de apă oxigenată 0,05% (0,2 ml).

Calculul rezultatelor. Activitatea peroxidazei se calculează după valoarea coeficientului de extincţie micromolară, egal cu 0,0128.

O unitate de peroxidază (UP) corespunde cantității de enzimă care catalizează descompunerea unui micromol de H_2O_2 într-un minut în condiții optime.

Numărul unităților peroxidazice într-un g de țesut se calculează cu ajutorul formulei:

UP / g / min = E / 0,0128 x 10 / 1000 x 1 / 5 x 10 / v x 1 / p, unde:

E – extincția probei citită la spectrofotometru;

0,0128 – valoarea extincției micromolare;

1000 – numărul de ml într-un litru;

v – volumul extractului peroxidazic (supernatant, în ml) introdus în mediul de reacție;

p – cantitatea de țesut vegetal sau animal, în g.

I.3.4.4. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII GLUTATION PEROXIDAZEI

Glutation peroxidaza (glutation redus: H_2O_2 – oxidoreductaza, EC 1.11.1.9) este o peroxidază descoperită în plasma sanguină, eritrocite şi diferite ţesuturi animale(ficat, muşchi, creier, plămâni etc.). Glutation peroxidaza (GPX) catalizează reducerea hidroperoxizilor, inclusiv a peroxidului de hidrogen, cu ajutorul glutationului redus. În organismul viu GPX îndeplineşte un rol important de protecţie a membranelor celulare împotriva prejudiciului oxidativ produs de peroxidarea lipidică. Deci, funcţia biologică a GPX constă în reducerea hidroperoxizilor lipidici la alcoolii corespunzători şi în reducerea peroxidului de hidrogen la apă. Cu excepţia GPX fosfolipid-hidroperoxidului care este un monomer, toate celelalte GPX sunt tetrameri alcătuiţi din 4 subunităţi glicoproteice identice. Fiecare subunitate conţine un rest de selenocisteină în centrul activ care participă direct în reducerea bi-electronică a substratului peroxidic. GPX utilizează glutationul ca ultimul donor de electroni pentru regenerarea formei reduse a selenocisteinei. Dacă integritatea membranelor celulare şi subcelulare depinde puternic de GPX, sistemul protector antioxidant al enzimei este condiţionat de prezenţa seleniului.

I.3.4.4.1. Determinarea activității glutation peroxidazei în serul sanguin (metoda Fukuzawa și Tokumura adaptată de Costel Darie și Vlad Artenie)

Principiul metodei. Glutation peroxidaza catalizează descompunerea peroxidului de hidrogen (H_2O_2) cu participarea glutationului redus (G-SH) ca reducător, rezultând glutationul oxidat (G-S-S-G) şi apă :



Gluationul redus rămas în exces reacţionează cu acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) formând un complex colorat în galben. Intensitatea culorii complexului se măsoară spectrofotometric la 412 nm. Diferenţa dintre cantitatea iniţială şi cea finală de glutation redus este direct proporţională cu activitatea glutation peroxidazei.

Reactivi. *1) Soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,4 M cu pH 7,0.* Se dizolvă 5,3425 g fosfat monosodic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) şi 21,8525 g fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) în 150 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 250 ml. După verificarea şi eventual corectarea pH-ului la 7 se aduce volumul soluţiei la 250 ml cu apă bidistilată.

2) Soluţie de glutation redus 5 mM. Se dizolvă 0,0384162 g glutation redus(G-SH) în 25 ml apă bidistilată. Această soluţia se prepară în momentul utilizării.

3) Soluţie de apă oxigenată 4 mM. Se diluează 0,04533 ml apă oxigenată concentrată (30%) la 100 ml cu apă bidistilată.

4) Soluție de acid metafosforic 7%. Se dizolvă 35 g acid metafosforic [$(HPO_3)_n$] în 500 ml apă distilată.

5) Soluție de fosfat disodic 0,3 M. Se dizolvă 107,451 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) în 1000 ml apă distilată.

6) Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M cu pH 7,0. Se amestecă 1 volum de soluție tampon de fosfați de sodiu 0,4 M cu pH 7,0 și 3 volume de apă distilată.

7) Soluție de acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic 0,04 % în soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M cu pH 7,0. Se dizolvă 0,040 g de acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) în 100 ml soluție tampon de fosfați 0,04 M cu pH 7,0.

Modul de lucru. În două eprubete – probă (P) și martor (M) – se măsoară următoarele volume de reactivi:

Reactiv	Probă (P)	Martor (M)
Soluție tampon fosfați 0,4 M cu pH 7,0 (ml)	1	2
Ser / plasmă (ml)	0,1 - 0,2	0,1 - 0,2
Apă bidistilată (ml)	0,1 – 0,0	0,1 – 0,0
Soluție de glutation redus 5 mM (ml)	1	-
Proba se incubează timp de 5 minute la 37°C		-
Soluție de apă oxigenată 4 mM (ml)	1	-
Proba se incubează din nou timp de 5 minute la 37°C		-

În două eprubete de centrifugă se măsoară câte 4 ml soluție de acid metafosforic 7%. În prima eprubetă se introduce 1 ml din incubatul corespunzător probei. În cealaltă eprubetă se pipetează 0,6875 ml din incubatul martorului, apoi 0,3125 ml soluție de glutation redus 5 mM. Conținutul eprubetelor se agită cu atenție și se lasă în repaus 10 minute. După trecerea timpului menționat, eprubetele se centrifughează timp de 15 minute la 3.000 rotații per minut.

În supernatantele separate se determină conținutul de glutation redus conform specificațiilor din tabelul următor:

Reactiv	Probă	Martor	Control
Apă distilată (ml)	-	-	1
Supernatant după centrifugare (ml)	1	1	0
Soluție de fosfat disodic 0,3 M (ml)	4	4	4
Soluție de DTNB 0,04 % (ml)	0,5	0,5	0,5

Se agită cu atenţie şi se lasă 5 minute în repaus la temperatura camerei. Se citeşte extincţia probei şi martorului la spectrofotometru la 412 nm, faţă de controlul reactivilor.

Calculul rezultatelor. O unitate de activitate a GPX se defineşte ca acea cantitate de enzimă care catalizează oxidarea unui micromol de G-SH per minut. Activitatea glutation peroxidazei exprimată în micromoli de glutation redus transformaţi de enzima dintr-un ml de ser/plasmă în timp de un minut (μM G-SH/ml/min) se calculează cu ajutorul formulei:

$$\mu M\ G-SH\ /\ ml\ /\ \min = \left(a_{martor} - a_{proba}\right) \times \frac{5 \times 3{,}2}{v \times 5 \times 1000 \times 307{,}33},$$

unde: a_{martor} - micrograme de glutation redus (G-SH) corespunzătoare extincţiei martorului, citite pe curba etalon;

a_{proba} – micrograme de glutation redus (G-SH) corespunzătoare extincţiei probei, citite pe curba etalon;

v – ml ser sau plasmă luaţi în lucru;

307,33 – masa unui micromol de G-SH, în mg.

Pentru aflarea microgramelor de glutation redus se construieşte o curbă etalon folosind cantităţile de 10, 20, 40, 60, 80, 100 şi 120 micrograme de glutation redus într-un ml de apă distilată. În fiecare etalon se pipetează 4 ml soluţie de fosfat disodic 0,3 M şi câte 0,5 ml soluţie de DTNB 0,04%. Conţinutul eprubetelor se agită şi se lasă în repaus timp de 5 minute. Se citesc extincţiile etaloanelor la 412 nm, faţa de un control al reactivilor realizat cu 1 ml de apă distilată în loc de soluţie de glutation.

I.3.4.4.2. Determinarea activităţii glutation peroxidazei în ţesuturile animale (metoda Fukuzawa şi Tokumura)

Principiul metodei. Acelaşi ca la *Lucrarea I.3.8.4.1.*

Reactivi. *1) Soluţie de clorură de potasiu 0,154 M.* Se dizolvă 1,1482 g de KCl în 100 ml apă bidistilată, la balon cotat.

2) Soluţie tampon de fosfaţi de sodiu 0,25M cu pH 7,4. Se dizolvă 1,6388 g fosfat monosodic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) şi 18.1359 g fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) în 150 ml apă bidistilată într-un balon cotat de 250 ml. După verificarea şi eventual corectarea pH-ului la 7,4 se aduce volumul soluţiei la 250 ml cu apă bidistilată.

3) Soluţie de glutation redus 50 mM. Se dizolvă 0,1536 g glutation redus (G-SH) în 10 ml apă bidistilată. Această soluţia se prepară în momentul utilizării.

4) Soluţie de apă oxigenată 50 mM. Se diluează 0,1419 ml apă oxigenată concentrată (30%) la 25 ml cu apă bidistilată.

5) Soluţie de EDTA 25 mM. Se dizolvă 0,9305 g dietilendiamintetraacetat disodic (Na_2EDTA) în 100 ml apă bidistilată.

6) Soluție de azidă de sodiu 0,4 M. Se dizolvă 0,26004 g de azidă de sodiu (NaN_3) în 10 ml de apă bidistilată. **ATENȚIE LA MANIPULAREA AZIDEI DE SODIU CARE ESTE O SUBSTANȚĂ TOXICĂ** (inhibitor al transferului de electroni în lanțul respirator).

7) Soluție de acid metafosforic 7%. Se dizolvă 35 g acid metafosforic [$(HPO_3)_n$] în 500 ml apă distilată.

8) Soluție de fosfat disodic 0,3 M. Se dizolvă 107,451 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) în 1000 ml apă distilată.

9) Soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M cu pH 7,0. Se amestecă 1 volum de soluție tampon de fosfați de sodiu 0,4 M cu pH 7,0 (Reactiv 1 la *Lucrarea I.3.8.4.1*) și 3 volume de apă distilată.

10) Soluție de acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic 0,04 % în soluție tampon de fosfați de sodiu 0,1 M cu pH 7,0. Se dizolvă 0,040 g de acid 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) în 100 ml soluție tampon de fosfați 0,04 M cu pH 7,0.

Modul de lucru. *A) PREPARAREA EXTRACTULUI ENZIMATIC.* Țesutul animal prelevat proaspăt sau conservat la 0°C în soluție de KCl 0,154 M se usucă prin tamponare cu hârtie de filtru. O cantitate de 0,500 – 0,600 g de țesut animal (ficat, creier etc.) se omogenizează cu 5 ml soluție de KCl 0,154 M (răcită într-o baie de gheață) într-un omogenizator Potter-Elvehjem. Omogenatul obținut se centrifughează timp de 15 minute la 4000 rotații per minut. Supernatantul separat servește ca sursă de enzimă.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂȚII GLUTATION PEROXIDAZEI. Mediul de incubație pentru determinarea activității glutation peroxidazei conține următorii reactivi:

- 0,2 ml extract enzimatic;
- 1,3 ml soluție tampon de fosfați 0,25 M cu pH 7,4;
- 0,1 ml soluție de EDTA 0,25 mM;
- 0,1 ml soluție de azidă de sodiu 0,4 M;

Amestecul de reacție se termostatează pentru 5 minute la 37°C. Apoi se adaugă 0,3 ml soluție de glutation redus 50 mM și se agită. La timpul zero se pipetează 0,1 ml soluție de apă oxigenată 50 mM și proba se introduce în termostat pentru 5 minute la 37°C. Reacția se stopează cu 2 ml soluție de acid metafosforic 7%.

În paralel cu proba se realizează și un martor în care soluția de apă oxigenată este înlocuită cu 0,1 ml apă distilată. Martorul nu se mai incubează în termostat. După centrifugarea probei și martorului timp de 15 minute la 3000 rotații per minut, se măsoară din fiecare câte 1 ml supernatant în care se determină glutationul redus conform protocolului de la *Lucrarea I.3.8.4.1* .

Calculul rezultatelor. Activitatea glutation peroxidazei se exprimă în micromoli de G-SH oxidaţi de enzima dintr-un gram de ţesut în timp de un minut (UGPX/g/min) şi se calculează cu ajutorul formulei:

$$UGPX/g/min = (a_{martor} - a_{probă})\frac{5 \times 4,1}{v \times p \times 5 \times 1000 \times 307,33},$$

unde: a_{martor} - micrograme de glutation redus (G-SH) corespunzătoare extincţiei martorului, citite pe curba etalon;

$a_{probă}$ – micrograme de glutation redus (G-SH) corespunzătoare extincţiei probei, citite pe curba etalon;

v – volumul (ml) de extract enzimatic luat pentru determinarea activităţii enzimei;

p – masa de ţesut analizat, în g;

307,33 – masa unui micromol de G-SH, în mg.

Activitatea specifică a GPX se află prin raportarea unităţilor enzimatice la mg de proteină.

I.3.4.5. DETERMINAREA ACTIVITĂŢII SUPEROXID DISMUTAZEI (METODA WINTERBOURN, HAWKINS, BRIAN ŞI CARRELL ADAPTATĂ DE VLAD ARTENIE)

Superoxid dismutaza (superoxid: superoxid oxidoreductaza, EC 1.15.1.1, SOD) catalizează dismutarea radicalului liber de superoxid $\cdot O_2^-$ în oxigen şi peroxid de hidrogen:



SOD este o enzimă antioxidantă care protejează celulele vii împotrivă efectelor nocive ale radicalilor liberi de superoxid care reprezintă una din formele cele mai nocive ale speciilor reactive de oxigen. Radicalul de superoxid este generat prin reducerea univalentă a O_2 în cursul diferitelor reacţii enzimatice sau sub acţiunea radiaţiilor ionizante. Întrucât SOD este prezentă în toate organismele aerobe şi în majoritatea compartimentelor subcelulare care generează oxigen activat, se consideră că această oxidoreductază deţine un rol central în protecţia contra stresului oxidativ care este asociat cu producerea de specii reactive de oxigen (ROS).

Există trei tipuri distincte de SOD care au fost clasificate pe baza metalului conţinut în structura lor: unele izoenzime ale Cu(II)-Zn(II) - SOD au fost descoperite în citosol iar altele în cloroplastele plantelor superioare; Mn(III) - SOD este prezentă în mitocondriile celulelor eucariote, precum şi în celulele procariotelor; Fe(III) - SOD a fost evidenţiată în celulele procariote şi în unele alge eucariote.

Principiul metodei. Activitatea superoxid dismutazei se determină pe baza capacităţii enzimei de a inhiba reducerea Nitro Blue Tetrazoliului (NBT) de către radicalii superoxid generaţi în mediul de reacţie prin fotoreducerea riboflavinei. Gradul de inhibiţie produs de enzimă în condiţii standard se estimează prin determinarea extincţiilor probei şi martorului la 560 nm, faţă de apa distilată.

Reactivi. *1) Soluţie tampon TRIS-HCl 0,1 M cu pH 7,8 conţinând 1 mmol dithiothreitol şi 1 mmol EDTA pentru extracţia SOD vegetale.* Într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 6,0568 g TRIS [Tris(hydroxymethyl)aminomethane: $C_4H_{11}NO_3$ = 121,1], 0,1861 g EDTA[etilendiamintetraacetat de sodiu] şi 0,0759 g dithiothreitol în 300 ml apă bidistilată. Se aduce pH-ul la 7,8 cu soluţie de acid clorhidric 1 N. Se completează la 500 ml cu apă bidistilată. Se păstrează la frigider.

2) Soluţie tampon TRIS-HCl 0,08 M cu pH 7,4 conţinând 250 mmol zaharoză, 5 mmol $MgCl_2$ şi 1 mmol EDTA disodic pentru extracţia SOD din ţesuturile animale. Într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 4,844 g TRIS, 42,7725 g zaharoză, 0,50835 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ şi 0,1861 g EDTA în 300 ml apă bidistilată. Se aduce pH-ul la 7,4 cu soluţie de acid clorhidric 1 N. Se completează la 500 ml cu apă bidistilată. Se păstrează la frigider.

3) Soluţie tampon de fosfaţi de potasiu 0,067 M , pH=7,8. Într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 0,2917 g KH_2PO_4 şi 5,4616 g K_2HPO_4 în 400 ml apă bidistilată. Se corectează pH-ul la 7,8 fie cu soluţie de KOH 1N, fie cu soluţie de acid fosforic 1: 3. Se completează cu apă bidistilată la 500 ml.

4) Soluţia de EDTA disodic 0,1M cu pH=7,8. Se dizolvă 3,7223 g etilendiamintetraacetat de sodiu (EDTA-$Na_2 \cdot 2H_2O$) în 75 ml apă bidistilată înt-un balon cotat de 100 ml. Se corectează pH-ul la 7,8 cu o soluţie de NaOH 1N şi se completează la semn cu apă bidistilată.

5) Soluţie de Nitro Blue Tetrazolium 1,5 mM. Se dizolvă 12,26 mg Nitro Blue Tetrazolium chloride în 10 ml apă bidistilată. Se conservă la rece.

6) Soluţie de ribofllavină 0,12 mM. Se dizolvă 4,516 mg riboflavină (vitamină B_2) în 100 ml apă bidistilată la balon cotat. Soluţia se păstrează în frigider, în flacon de culoare brună sau învelit cu folie de staniol.

Modul de lucru. *A) EXTRACŢIA SUPEROXID DISMUTAZEI.* O cantitate de 0,1 – 0,2 g ţesut animal (ficat, muşchi, creier etc.) sau ţesut vegetal (seminţe în curs de germinare, plantule, frunze, rădăcini etc.) sau biomasă microbiană se omogenizează prin mojarare cu sticlă pisată în prezenţa unui volum de 1,5 ml soluţie tampon de extracţie răcită la +4°C. Apoi omogenatul este supus centrifugării la rece timp de 15 minute la 10.000 rot./min. Supernatantul astfel obţinut în urma centrifugării va fi folosit ca sursă de superoxid dismutază.

B) DETERMINAREA ACTIVITĂŢII SUPEROXID DISMUTAZEI. Pentru determinarea activităţii superoxid dismutazei se procedează conform indicaţiilor din tabelul următor:

Reactivi	Probă	Martor
Soluţie tampon fosfaţi de K 0,067 M, pH 7,8 (ml)	2,55	2,55
Soluţie de EDTA 0,1 M cu pH 7,8 (ml)	0,20	0,20
Extract enzimatic, ser sanguin sau lichid de cultură (ml)	0,10	-
Soluţie de Nitro Blue Tetrazolium 1,5 mM (ml)	0,1	0,1
Soluţie de riboflavină 0,12 mM (ml)	0,05	0,05

Atât proba cât şi martorul se expun iluminării timp de exact 5 minute la o lampă cu neon, la distanţa de 10 cm. Se citesc extincţiile probei şi martorului la 560 nm, faţă de apă distilată. Înainte de introducere în cuva spectrofotometrului, în martor se adaugă 0,1 ml extract enzimatic, ser sanguin sau lichid de cultură, se agită şi repede se citeşte extincţia (E_{martor}), în aceleaşi condiţii ca pentru probă ($E_{probă}$).

Calculul rezultatelor. O unitate de SOD reprezintă acea cantitate de enzimă care cauzează o inhibiţie de 50% din maximul de inhibiţie a reducerii NBT.

În martor, care nu conţine SOD, radicalii superoxid, formaţi prin fotoreducerea riboflavinei, reduc NBT la un formazan, intensitatea culorii albastre fiind maximă (100 % inhibiţie).

În probă, SOD transformă o parte din radicalii superoxid în peroxid de hidrogen, iar cantitatea de formazan formată este mai mică.

Procentul de inhibiţie realizat de enzima din probă se calculează utilizând relaţia:

$$\% \text{ inhibiţie} = 100 - \frac{E_{probă} \times 100}{E_{martor}}$$

, unde:

$E_{probă}$ - extincţia probei;

E_{martor} – extincţia martorului.

În cazul lichidelor biologice (ser sanguin, lichid cefalorahidian, lichid de cultură etc.), activitatea SOD se calculează în unităţi enzimatice / ml / min, cu ajutorul formulei:

$$USOD / ml / min = \left[100 - \frac{E_{probă} \times 100}{E_{martor}}\right] \times \frac{1}{50 \times 5 \times 0{,}1}$$

Pentru aflarea unităţilor de SOD adică a gradului de inhibiţie produs de enzima dintr-un gram de ţesut animal sau vegetal în timp de 1 minut se va folosi formula:

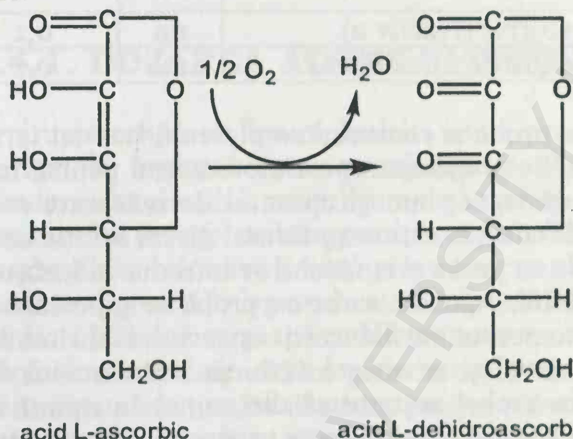
$$\% \text{ inhibitie} / g / min = \left[100 - \frac{E_{probă} \times 100}{E_{martor}}\right] \times \frac{1{,}5}{0{,}1 \times 5 \times p} \times \frac{1}{50},$$

unde p este masa de ţesut animal sau ţesut vegetal sau biomasă microbiană cântărită.

Activitatea SOD se raportează la concentraţia de proteină în extractul enzimatic, serul sanguin sau lichidul de cultură. Cu alte cuvinte se va calcula activitatea specifică a SOD raportând numărul unităţilor enzimatice la numărul mg de proteină corespunzător.

I.3.4.6. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ASCORBAT OXIDAZEI ÎN PLANTE (METODA M. F. OBERBACHER ȘI H. M. VINES)

Ascorbat oxidaza (L-ascorbat: O_2-oxidoreductaza, EC 1.10.3.3) catalizează oxidarea directă a acidului L-ascorbic în acid L-dehidroascorbic:



Funcționând ca transportor de hidrogen, rolul acidului ascorbic este strâns corelat cu toate sistemele enzimatice participante în metabolismul respirator al celulei animale și vegetale.

Ascorbat oxidaza conține în compoziția sa 0,24% cupru, deci este o metaloenzimă. Enzima din extractele de varză, castraveți, dovleac manifestă o activitate foarte ridicată.

Principiul metodei. Activitatea ascorbat oxidazei se determină spectrofotometric la 265 nm și 25°C, prin urmărirea scăderii cantității de acid ascorbic oxidat de enzima din extract. O unitate de ascorbat oxidază reprezintă cantitatea de enzimă care catalizează oxidarea 1 micromol de acid ascorbic la 25°C.

Reactivi. *1) Soluție tampon de fosfat monopotasic-fosfoat disodic 0,1 M, cu pH 5,6, conținând 5 mM EDTA.* Se dizolvă 6,42 g KH_2PO_4, 0,9274 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ și 0,0930 g EDTA (etilendiaminotetraacetat disodic) în 400 ml apă bidistilată, se corectează pH la 5,6 (cu HCl 1 N sau soluție de NaOH 1 N) și se completează la 500 ml cu apă bidistilată.

2) Soluție de acid ascorbic 0,005 M. Se dizolvă 4,4 mg de acid ascorbic în 5 ml apă bidistilată, răcită pe gheață. Soluția de acid ascorbic se păstrează pe gheață și se prepară în momentul utilizării.

Modul de lucru. O cantitate de 0,2 - 1 g material vegetal proaspăt prelevat (în funcție de activitatea enzimei în organul cercetat) se mojarează cu soluție tampon de fosfați 0,1 M cu pH 5,6 (reactiv 1). Omogenatul obținut se aduce la un volum de 10 ml cu aceeași soluție tampon, se agită și se supune filtrării sau centrifugării, la rece. Extractul

enzimatic astfel obţinut, se foloseşte imediat pentru determinare, întrucât activitatea ascorbat oxidazei se diminuează chiar la rece.

Pentru determinarea activităţii ascorbat oxidazei în două cuve de cuarţ de 10 mm – una probă şi alta control – se măsoară:

Componentele mediului de reacţie		Probă	Control
Soluţie tampon de fosfaţi 0,1 M şi pH 5,6 (reactiv 1)	ml	2,9	3,0
Soluţie de acid ascorbic (reactiv 2)	ml	0,1	0,1
Extract enzimatic (ascorbat oxidază)	ml	0,1	-

Cuvele cu proba şi controlul se plasează într-un termostat la 25°C pentru 5 minute. Se pregăteşte spectrofotometrul pentru lucru: se fixează lungimea de undă la 265 nm şi aparatul de măsurare se aduce la zero folosind o cuva de cuarţ în care s-a măsurat 3,1 ml soluţie tampon de fosfaţi (reactiv 1). Cuvele cu proba şi controlul se introduc în locaşul lor. Se citeşte extincţia controlului. Apoi în cuva cu probă se pipetează 0,1 ml extract enzimatic. În momentul introducerii extractului enzimatic în probă se deschide cronometrul şi se citeşte extincţia amestecului de reacţie. Mai departe, extincţia probei se notează din minut în minut în decurs de 5 minute. Scăderea extincţiei probei este proporţională cu timpul.

Calculul rezultatelor. Activitatea ascorbat oxidazei se exprimă în micromoli de acid ascorbic oxidat per minut de enzima din 1 g ţesut umed. Mai întâi, se calculează micromolii de acid ascorbic oxidat de ascorbat oxidaza dintr-un ml de extract enzimatic, după formula:

$$UAO/min/ml = \frac{D.O. - D.O._1}{t} \times \frac{3,1}{13,386} \times \frac{10}{0,1}$$

Apoi, se raportează activitatea ascorbat oxidazei la 1 g de ţesut cercetat, în care scop se utilizează următoarea formulă:

$$UAO/min/g = \frac{D.O. - D.O._1}{t} \times \frac{3,1}{13,386} \times \frac{10}{0,1} \times \frac{1}{p}$$

, unde:

D.O. – densitatea optică sau extincţia controlului la începutul determinării;

D.O.₁ - densitatea optică sau extincţia probei după un interval determinat de timp;

t - timpul, în minute;

13,386 – coeficientul de extincţie micromoleculară;

0,1 – volumul de extract (supernatant) enzimatic, în ml;

p – greutatea materialului vegetal cântărit, în g .

Rezultatele se pot exprima şi în unităţi per mg de proteină solubilă:

$$UAO / mg = \frac{UAO / min / ml}{mg \ proteină / ml \ extract \ enzimat}$$

I.4. DOZAREA UNOR PRODUŞI INTERMEDIARI ŞI FINALI AI METABOLISMULUI GLUCIDIC

I.4.1. DOZAREA ACIDULUI PIRUVIC

Acidul piruvic ocupă un loc central în multe procese metabolice, constituind veriga de legătură între metabolismul glucidic, lipidic şi proteic. Formându-se în glicoliză, acidul piruvic se poate transforma prin transaminare în alanină şi astfel se integrează în metabolismul proteinelor. Apoi, prin decarboxilare oxidativă acidul piruvic se transformă în acetil-CoA, care poate intra în reacţiile legate de metabolismul lipidelor sau poate să se oxideze la dioxid de carbon şi apă cu eliberare de energie.

Principiul metodei. Acidul piruvic reacţionează cu aldehida salicilică în mediul puternic alcalin dând un produs colorat în portocaliu. Intensitatea culorii acestui produs, proporţională cu concentraţia acidului piruvic se determină spectrofotometric.

Reactivi. *1) Soluţie de acid tricloracetic 6%.*

2) Soluţie de hidroxid de potasiu. 100 g de hidroxid de potasiu (KOH) se dizolvă în 60 ml apă distilată. Dacă soluţia depune precipitat se ia pentru reacţie lichid supernatant limpede.

3) Soluţie de aldehidă salicilică 2% în alcool etilic 96%. Soluţia este stabilă câteva luni.

4) Soluţie stoc de piruvat de sodiu. Se dizolvă 124,9 mg de piruvat de sodiu în 100 ml apă distilată la balon cotat. Se prepară extemporaneu (în momentul determinării).

5) Soluţie etalon de piruvat de sodiu. Într-un balon cotat de 50 ml se măsoară 1 ml soluţie stoc de piruvat de sodiu şi se completează la semn cu apă distilată. Într-un ml soluţie etalon se găsesc 0,02 mg acid piruvic.

Modul de lucru. *A) DEPROTEINIZAREA.* Într-o eprubetă de centrifugă se iau 1 ml sânge oxalatat recoltat proaspăt. Se adaugă 1 ml soluţie de acid tricloracetic 6%, se agită şi se lasă 5 minute în repaus. Apoi se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rot/min.

B) DEZVOLTAREA CULORII. În două eprubete se măsoară reactivii indicaţi în tabelul următor.

Reactivi	Probă	Control
Supernatant incolor şi transparent(ml)	1	-
Apă distilată (ml)	-	0,5

Reactivi	Probă	Control
Soluţie de acid tricloracetic 6% (ml)	-	0,5
Soluţie de hidroxid de potasiu (ml)	1	1
Soluţie de aldehidă salicilică (ml)	0,5	0,5

Se agită bine şi se introduc eprubetele în baia de apă la 37°C pentru 10 minute. Se răcesc repede şi se citeşte extincţia probei de cercetat la spectrofotometru, la 470 nm faţă de control.

Calculul rezultatelor. Pentru calcularea cantităţii de acid piruvic în volumul de filtrat luat pentru reacţia de culoare se trasează o curbă etalon conform tabelului de mai jos.

Specificaţie	1	2	3	4	5	6	7
Concentraţia acidului piruvic în probă (mg)	0,002	0,004	0,008	0,012	0,016	0,020	0
Soluţie etalon de piruvat de sodiu (ml)	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	0
Apă distilată (ml)	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0	1,0
Soluţie de KOH (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Soluţie de aldehidă salicilică (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Se agită bine, se termostatează timp de 10 minute la 37°C, se răcesc eprubetele şi se citesc extincţiile probelor 1-6 la 470 nm, faţă de proba 7.

Se trasează curba etalon notând pe ordonată extincţiile iar pe abscisă concentraţia acidului piruvic în probe.

Notând cu **a** mg de acid piruvic găsite pe curba etalon după extincţia probei de cercetat, cantitatea de acid piruvic în 100 ml sânge se calculează cu ajutorul formulei:

mg acid piruvic / 100 ml sânge = **a**×2×100 = **a**×200

Variaţii fiziopatologice. În sângele omului sănătos conţinutul acidului piruvic reprezintă 0,5-1,5 mg%. Creşterea concentraţiei de acid piruvic în sânge se constată după efort muscular, emoţii puternice, regim alimentar bogat în glucide.

Cantitatea acidului piruvic în sânge poate să crească în avitaminoză B_1. Aceasta se explică prin aceea, că în lipsa vitaminei B_1 care sub formă de tiaminpirofosfat constituie una din coenzimele piruvatdehidrogenazei (piruvat:lipoat-oxidoreductaza, E.C. 1.2.4.1), este tulburat procesul de decarboxilare oxidativă a acidului piruvic şi ca urmare se observă acumularea acestui acid în sânge.

În unele cazuri creşterea acidului piruvic în sânge poate să fie provocată de anoxie şi leziuni ale ficatului.

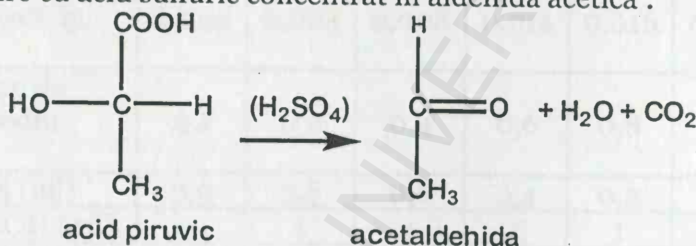
OBSERVAŢII. Metoda descrisă poate fi folosită şi pentru dozarea acidului piruvic în ţesuturi (ficat, muşchi, creier etc.). În acest caz, o cantitate determinată de ţesut (0,5-1 g) se omogenizează cu sticlă pisată într-un mojar răcit, de unde se preia cu 2,5 ml soluţie de acid tricloracetic 6%. Se centrifughează timp de 15 minute la 4000 rot./min. În supernatantul separat se dozează acidul piruvic conform protocolului de mai sus.

I.4.2. DOZAREA ACIDULUI LACTIC (METODA BARKER ŞI SUMMERSON MODIFICATĂ)

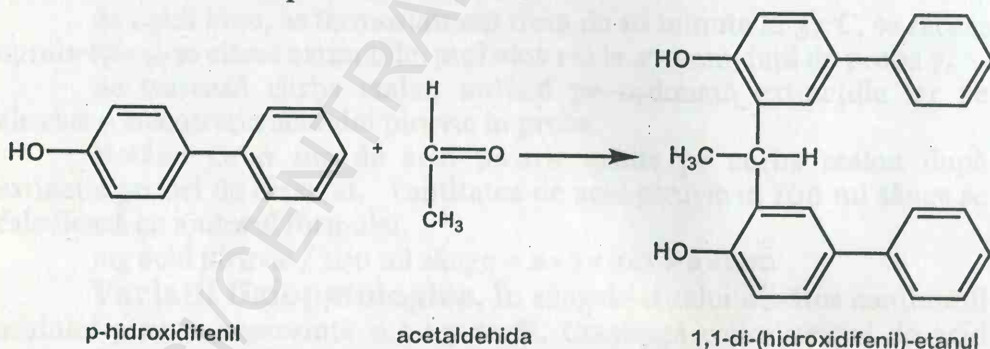
Acidul lactic este produsul final al glicolizei în condiţii anaerobe. În efortul muscular, când necesitatea de energie este asigurată temporar printr-o glicoliză intensă cantitatea acidului lactic creşte apreciabil în ţesutul muscular şi în sânge. Pe calea sângelui acidul lactic ajunge la ficat, unde parţial se oxidează în acid piruvic (care se catabolizează aerob la CO_2 şi H_2O) iar parţial se transformă în glucoză sau glicogen.

Acidul lactic este larg răspândit, de asemenea, în diferite specii de plante, ciuperci şi bacterii (bacteriile lactice).

Principiul metodei. Proteinele se îndepărtează prin precipitare cu acid tricloracetic iar glucidele prin precipitare cu hidroxid de calciu în prezenţa sulfatului de cupru. Acidul lactic prezent în filtrat se transformă prin încălzire cu acid sulfuric concentrat în aldehidă acetică :



Aldehida acetică formată se condensează cu p-hidroxidifenilul, rezultînd 1,1-di-(hidroxidifenil)-etanul, care în prezenţa acidului sulfuric se oxidează într-un complex colorat în violet :



Intensitatea culorii complexului din mediul de reacţie este proporţională cu cantitatea de aldehidă, prin urmare şi cu cantitatea de acid lactic.

Reactivi. *1) Soluţie de acid tricloracetic 5%.*
2) Soluţie de sulfat de cupru 20%.
3) Soluţie de sulfat de cupru 4%.
4) Hidroxid de calciu p.a..
5) Acid sulfuric concentrat (ρ=1,84).

6) Soluţie de p-hidroxidifenil 1,5% în soluţie de hidroxid de sodiu 0,5%. Se recomandă mojararea p-hidroxidifenilului la pudră fină înainte de prepararea soluţiei în momentul utilizării. Soluţia este stabilă 2 - 3 săptămâni.

7) Soluţie stoc de lactat de litiu. Într-un balon cotat de 50 ml se dizolvă 26,66 mg de lactat de litiu în 5 ml soluţie de acid sulfuric diluat (1:10) şi se completează la semn cu apă distilată. Un ml de soluţie stoc de lactat de litiu conţine 0,5 mg de acid lactic. Soluţia stoc de lactat de litiu se prepară în momentul utilizării.

8) Soluţie etalon de lactat de litiu. Se introduc 2 ml de soluţie stoc de lactat de litiu (Reactiv 7) într-un balon cotat de 25 ml şi se completează la semn cu apă distilată. Un ml din soluţia etalon conţine 0,040 mg de acid lactic. Soluţia etalon de lactat de litiu se prepară în momentul utilizării.

Modul de lucru. *A) PRECIPITAREA PROTEINELOR.* În două eprubete de centrifugă se măsoară câte 0,2 ml sânge sau ser. Se adaugă câte 0,8 ml soluţie de acid tricloracetic 5%, se agită şi după ce se lasă în repaus 5 minute se centrifughează.

B) SEPARAREA GLUCIDELOR. Fără a decanta supernatantul şi fără a se aduce în suspensie precipitatul se adaugă 0,4 ml soluţie de sulfat de cupru 20%, apoi 0,25 g de hidroxid de calciu fin pulverizat şi 0,35 ml apă distilată. Se agită supernatantul din 5 în 5 minute într-un interval de timp de 20 minute. Se trece precipitatul în suspensie şi după 10 minute amestecul se centrifughează timp de 15 minute la 3000 rotaţii/minut.

C) TRANSFORMAREA ACIDULUI LACTIC ÎN ACETALDEHIDĂ. Se măsoară câte 0,5 ml supernatant limpede în alte eprubete curate, introduse într-un pahar cu apă rece sau amestec de apă cu gheaţă. În fiecare eprubetă se adaugă câte 0,05 ml (o picătură) soluţie de sulfat de cupru 4% şi picătură cu picătură, 3 ml de acid sulfuric concentrat (dintr-o biuretă). Amestecul se agită cu atenţie şi eprubetele se introduc pentru 5 minute în baia de apă la fierbere, după care se răcesc la temperatura de 20°C.

D) EFECTUAREA REACŢIEI DE CULOARE CU P-HIDROXIDIFENIL. În amestecul din eprubetele bine răcite (până la 20°C, o răcire necorespunzătoare a amestecului duce la descompunerea p-hidroxidifenilului şi ca atare se obţin rezultate scăzute în determinarea acidului lactic) se adaugă câte 0,05 ml (o picătură) de soluţie alcalină de p-hidroxidifenil. Eprubetele se lasă 30 minute la temperatura camerei agitând uşor din timp în timp conţinutul lor pentru dizolvarea precipitatului format prin adăugarea p-hidroxidifenilului. În acest timp amestecul de reacţie capătă culoarea albastră. După ce au trecut 30 minute, eprubetele se introduc pentru 90 secunde într-o baie de apă la fierbere. În cursul acestei fierberi are loc clarificarea amestecului ca urmare a distrugerii excesului de p-hidroxidifenil, iar culoarea albastră trece în culoarea violet, stabilă mult timp (până la 3 ore).

E) MĂSURAREA INTENSITĂŢII CULORII. După fierbere, eprubetele se răcesc în apă rece şi se determină intensitatea culorii la 560

nm, faţă de un control al reactivilor. Acesta se realizează în paralel cu probele de cercetat începând de la momentul (c). În loc de supernatant se măsoară 0,5 ml apă distilată şi apoi se procedează la fel ca şi în cazul probelor de cercetat.

Calculul rezultatelor. După extincţiile probelor de cercetat se găseşte pe curba etalon concentraţia acidului lactic în volumul de supernatant luat pentru reacţia de culoare.

Cantitatea de acid lactic, exprimată în mg, în 100 ml sânge se calculează după formula:

$$mg\,\% = \frac{a\,.\,2\,.\,100}{0{,}5\,.\,0{,}2\,.\,1000} = a\,.\,2$$

, unde :

a - cantitatea de acid lactic (în micrograme) corespunzătoare extincţiei probei de cercetat, găsită pe curba etalon ;

100 - coeficient de transformare în procente ;

1000 - coeficient de transformare în mg.

CONSTRUIREA CURBEI ETALON. Pentru construirea curbei etalon se prepară seria de soluţii etalon indicată în tabelul următor.

Reactivi	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentraţia acidului lactic în probă (micrograme)	1	2	4	8	12	16	20	0
Soluţie etalon de lactat (ml)	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0
Apă distilată (ml)	0,475	0,45	0,4	0,3	0,2	0,1	0	0,3

Cu seria de soluţii etalon preparată se efectuează reacţia de culoare în modul descris mai sus (începând de la momentul *C*). Măsurarea extincţiei etaloanelor se face la 560 mn, faţă de proba de control (8).

Valori fiziologice. În sângele omului sănătos aflat în repaus concentraţia acidului lactic este de 5-20 mg% sau 2 mmoli/L în sângele venos, iar în cel arterial la valori pe jumătate. După un prânz, valorile lactacidemiei cresc cu 20-50%.

Fiziologic concentraţia acidului lactic sanguin poate creşte temporar ca urmare a intensificării procesului de glicoliză anaerobă în muşchi, în urma unui efort fizic intens.

Patologic, nivelul acidului lactic sanguin creşte în insuficienţa respiratorie, şoc, colaps circular, deshidratare severă, cetoacidoză diabetică. Un nivel ridicat al acidului lactic indică o acidoză lactică. Nivelul ridicat de acid lactic în lichidul cefalorahidian (LCR) denotă o infecţie la nivelul sistemului nervos central.

Determinarea raportului lactat/piruvat este utilă în insuficienţa cardiacă sau insuficienţa respiratorie grave. Cu cât acest raport este mai mare, cu atât severitatea insuficienţei este mai gravă (hipoxie tisulară).

OBSERVAŢII. 1. În prezenta metodă foarte mare importanţă are spălarea corectă a sticlăriei. După indicaţiile unor autori, rezultatele pot fi influenţate chiar de simpla atingere cu degetul a pereţilor interiori ai eprubetei, din cauza prezenţei acidului lactic în transpiraţie. Pentru îndepărtarea urmelor ionului de crom care împiedică dezvoltarea culorii, sticlăria se spală cu apă distilată după tratarea cu amestec cromic şi se introduce într-o soluţie de hidroxid de sodiu N/10 timp de 30-40 minute, apoi se repetă spălarea cu o cantitate mare de apă distilată şi se usucă. Se poate curăţa sticlăria şi prin fierbere timp de 30 minute în soluţie de detergent 0,5%, se spală de două ori cu apă distilată în care se fierbe 20 minute, se clăteşte şi se usucă.

2. După metoda descrisă mai sus se poate determina conţinutul de acid lactic şi în lichidul cefalorahidian (LCR). Creşterea nivelului de acid lactic în LCR dovedeşte o infecţie a sistemului nervos central, mai ales în prezenţa unei concentraţii scăzute de D-glucoză ca urmare a utilizării ei intense pe cale anaerobă. În tumorile intracraniene se constată creşterea lactatului în LCR datorită perturbării circulaţiei sanguine.

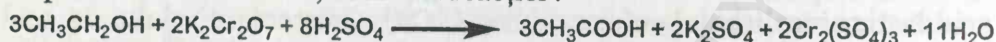
3. Metoda de mai sus se poate aplica, de asemenea, pentru dozarea acidului lactic în lichidul rezultat prin cultivarea diferitelor specii de bacterii care catabolizează glucoza pe calea fermentaţiei lactice. Catabolizarea anaerobă a glucidelor pe calea fermentaţiei lactice este răspândită la obţinerea unor produse alimentare şi industriale ca lapte, bere, vin, sucuri de legume şi fructe, plămezi folosite la fabricarea spirtului, pâinii etc.

4. Metoda descrisă poate fi folosită şi pentru dozarea acidului lactic în ţesuturi (ficat, muşchi, creier etc.). În acest caz, o cantitate determinată de ţesut (0,5-1 g) se omogenizează cu sticlă pisată într-un mojar răcit, de unde se preia cu 2,5 ml soluţie de acid tricloracetic 5%. Omogenatul obţinut se supune centrifugării timp de 15 minute la 4000 rot./min. În supernatantul separat se dozează acidul lactic după protocolul de mai sus.

I.4.3. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A ALCOOLULUI ETILIC (METODA MARTIN – BOIDEN)

Multe specii de bacterii, levuri şi ciuperci obţin energia necesară prin catabolizarea glucidelor pe calea fermentaţiei alcoolice, în care produsul final principal este alcoolul etilic (etanolul).

Principiul metodei. În condiţii controlate şi în prezenţa acidului sulfuric, alcoolul etilic este oxidat de o soluţie titrată de bicromat de potasiu la acid acetic, conform reacţiei :



$$3CH_3CH_2OH + 2K_2Cr_2O_7 + 8H_2SO_4 \longrightarrow 3CH_3COOH + 2K_2SO_4 + 2Cr_2(SO_4)_3 + 11H_2O$$

Excesul de bicromat de potasiu rămas netransformat este determinat iodometric prin titrare cu tiosulfat de sodiu în prezenţa amidonului ca indicator :



$$K_2Cr_2O_7 + 6KI + 7H_2SO_4 \longrightarrow 3I_2 + Cr_2(SO_4)_3 + 4K_2SO_4 + 7H_2O$$



$$I_2 + Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Făcând diferenţa între cantitatea iniţială şi excesul de bicromat de potasiu se calculează cantitatea de alcool etilic conţinut în probă. De notat că, în condiţiile date, transformarea alcoolului etilic în acid acetic este cantitativă şi că acidul acetic format nu se oxidează mai departe.

Reactivi. *1) Soluţie de bicromat de potasiu 0,4 N* . Se dizolvă 1,9600 g de bicromat de potasiu (cântărit la balanţa analitică) în 100 ml apă distilată, la balon cotat.

2) Acid sulfuric concentrat (c=98%, ρ=1,84g/cm³).

3) Soluţie de iodură de potasiu (KI) 20 %.

4) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N. Se dizolvă 25 de g de tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) în 1000 ml de apă distilată, în prealabil fiartă şi răcită, pentru îndepărtarea CO_2. După trecerea a 2 - 3 zile, se stabileşte factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu cu ajutorul unei soluţii de bicromat de potasiu 0,1 N.

5) Soluţie de amidon 1%. Se suspendă 1g de amidon solubil în 20 ml de apă distilată rece. În paralel se pun la fiert 80 ml de apă distilată. Când apa începe să fiarbă, se adaugă suspensia de amidon şi se continuă fierberea încă 3 – 5 minute. Se lasă să se răcească şi se poate conserva la frigider 1 – 2 săptămâni.

Modul de lucru. Se distilează 10 ml din lichidul de analizat. Volumul lichidului de analizat se va măsura cu precizie dintr-o biuretă. Pentru distilarea se va utiliza un balon de 50 – 100 ml cu fund rotund la care se ataşează un refrigerent de aer, îndoit la 45° şi efilat la capătul curbat. Capătul efilat se introduce într-o eprubetă cu diametrul de 3-4 cm şi lungimea de 20 cm în care în prealabil s-au pus 25 ml de soluţie de bicromat de potasiu 0,4 N şi 30 ml soluţie de acid sulfuric concentrat.

Distilarea se face la flacără mică şi se continuă până când în balonul rotund mai rămân circa 3 – 4 ml de lichid. Vaporii de alcool intră în amestecul oxidant unde se oxidează la acid acetic. Amestecul din eprubetă va fi trecut cantitativ într-un balon cotat de 100 ml care va fi completat la semn cu apă distilată.

Din soluţia rezultată în balonul cotat se iau volume de 25 ml şi se trec în flacoane Erlenmeyer de 200 ml, se adaugă 10 ml soluţie de KI 20% şi circa 65 ml de apă distilată, se agită cu atenţie pentru a nu sări picături pe pereţii vasului, se acoperă vasul şi se lasă la întuneric pentru 15 minute.

Iodul pus în libertate în urma reacţiei dintre bicromat şi iodura de potasiu va fi titrat cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N de factor cunoscut, în prezenţa soluţiei de amidon 1% ca indicator. Titrarea se face de la culoarea maronie a soluţiei conţinând iod până la culoarea galben – murdar apoi se adaugă câteva picături de soluţie de amidon 1% şi se continuă titrarea până la dispariţia culorii albastru închis a complexului de adsobţie a iodului cu amidonul. Culoarea finală a soluţiei este verde-pal albăstrui dată de ionii de Cr^{3+}. Notăm cu V_1 volumul de tiosulfat consumat.

În paralel într-un balon cotat de 100 ml se vor introduce 25 ml de soluţie de bicromat de potasiu 0,4 N şi 30 ml soluţie de acid sulfuric concentrat şi se completează la semn cu apă distilată. Din soluţia rezultată se vor lua volume de 25 ml care se vor supune aceloraşi operaţii ca mai sus (se adaugă iodură de potasiu şi apă distilată, se pun la întuneric şi se titrează cu tiosulfat). Notăm cu V_2 volumul de tiosulfat consumat.

Calculul rezultatelor. Diferenţa V_2-V_1 reprezintă cantitatea de tiosulfat de sodiu corespunzătoare cantităţii de bicromat care a reacţionat cu etanolul din probă. Trebuie ţinut cont de faptul că s-a făcut o diluare de 4 ori a soluţiei iniţiale de bicromat.

Ştiut fiind că reacţiile chimice decurg de la echivalent-gram la echivalent-gram, putem scrie:

$$1\ Eg\ K_2Cr_2O_7 \text{ ------------- } 1\ Eg\ Na_2S_2O_3$$



$$T_{K_2Cr_2O_7} \times V_{K_2Cr_2O_7} \text{ ------------- } T_{Na_2S_2O_3} \times 4 \times (V_2 - V_1)_{Na_2S_2O_3},$$

respectiv :



$$1\ Eg\ etanol \text{ ---------------- } 1\ Eg\ K_2Cr_2O_7$$

$$Xg\ etanol \text{ ---------------- } T_{K_2Cr_2O_7} \times V_{K_2Cr_2O_7}$$

Din aceste două relaţii, prin tranzitivitate, obţinem :



$$1\ Eg\ etanol \text{ ---------------- } 1\ Eg\ Na_2S_2O_3$$

$$Xg\ etanol \text{ ---------------- } T_{Na_2S_2O_3} \times 4 \times (V_2 - V_1)_{Na_2S_2O_3}$$

De aici :

$$Xg\ etanol = \frac{T_{Na_2S_2O_3} \times 4 \times (V_2 - V_1)_{Na_2S_2O_3} \times E_{g\ etanol}}{E_{g\ Na_2S_2O_3}}$$

sau înlocuind cu valorile cunoscute :

$$X_{g\ etanol} = 0{,}0046 \times F_{Na_2S_2O_3} \times (V_2 - V_1)_{Na_2S_2O_3}$$

Cantitatea de etanol în mililitri corespunzătoare probei analizate este :

$$V_{ml\ etanol} = \frac{X_{g\ etanol}}{0.794}$$

Întrucât pentru determinare s-au utilizat 10 ml de lichid de analizat conţinând alcool, atunci procentul de etanol (exprimat V/V) va fi : $10 \times V_{ml\ etanol}$.

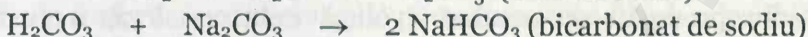
OBSERVAŢIE. Metoda descrisă este folosită pentru determinarea concentraţiei alcoolice a lichidelor de fermentaţie, precum şi a unor produse slab alcoolice (kefir, oţet, siropuri de fructe etc.)

I.4.4. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A DIOXIDULUI DE CARBON (METODA STAS)

Principiul metodei. Dioxidul de carbon existent în lichidele de fermentaţie sau diferite produse alimentare se absoarbe într-o soluţie de carbonat de sodiu (Na_2CO_3) N/5 (0,2N) în exces, transformându-se în bicarbonat de sodiu ($NaHCO_3$) conform reacţiilor :



$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3 \text{ (acid carbonic)}$$



$$H_2CO_3 + Na_2CO_3 \rightarrow 2\,NaHCO_3 \text{ (bicarbonat de sodiu)}$$

Cantitatea de carbonat de sodiu care nu a reacţionat este titrată cu soluţie de acid clorhidric (HCl) N/10 (0,1N) în prezenţa fenolftaleinei ca indicator :



$$Na_2CO_3 + 2\,HCl \rightarrow 2\,NaCl + H_2O + CO_2$$

Diferenţa dintre cantitatea iniţială şi cea finală de carbonat de sodiu va reprezenta dioxidul de carbon din lichidul analizat.

Reactivi. *1) Apă distilată* (fiartă şi răcită pentru eliminarea urmelor de CO_2).

2) Soluţie de carbonat de sodiu (Na_2CO_3) 0,2 N. Se vor cântări la balanţa tehnică 5,3 g carbonat de sodiu anhidru şi se vor dizolva în apă distilată, în prealabil fiartă şi răcită, într-un balon cotat de 500 ml. Titrul soluţiei rezultate se va stabili cu ajutorul unei soluţii de HCl 0,1 N cu factorul cunoscut.

3) Soluţie de HCl 0,1N. Cu ajutorul unui cilindru gradat de 10 ml se vor măsura 5 ml de soluţie concentrată de HCl şi se vor adăuga cu atenţie peste un volum de circa 200 ml de apă distilată într-un balon cotat de 500 ml. Se completează la semn cu apă distilată şi se agită bine. **Operaţia de preparare a soluţiei de HCl 0,1 N se va executa în nişă!!!!** Se stabileşte factorul soluţiei de HCl 0,1 N cu ajutorul unei soluţii de hidroxid de sodiu 0,1 N de factor cunoscut.

4) Soluţie alcoolică de fenolftaleină 1%. Se dizolvă 0,5 g de fenolftaleină în 50 ml alcool etilic 70 %.

Modul de lucru. Într-un pahar Berzelius de 600 ml se transvazează cantitativ 50 ml soluţie de Na_2CO_3 0,2 N, folosind un balon cotat. Acesta se spală de 2-3 ori cu câte 10-15 ml apă distilată fiartă care se toarnă peste soluţia de carbonat de sodiu. Apoi se adaugă cu o pipetă 25 ml lichid de analizat răcit la 0°C. Eliminarea lichidului de analizat din pipetă se va face introducând vârful acesteia în soluţia de Na_2CO_3. Se agită uşor şi se adaugă apoi 400 ml apă distilată, câteva picături de soluţie alcoolică de fenolftaleină 1% şi se titrează cu soluţie de HCl 0,1 N până la decolorarea completă a soluţiei de Na_2CO_3.

În paralel se face o probă pentru eliminarea efectului produs de existenţa în lichidul de analizat a unor substanţe cu caracter acid altele

decât CO_2. Pentru aceasta într-un pahar Berzelius identic cu primul se pun 25 ml din proba de analizat, se adaugă 100 ml apă distilată şi se aduce lichidul la fierbere cu agitare continuă pentru a uşura eliminarea CO_2. Când lichidul începe să fiarbă se întrerupe încălzirea spre a se evita evaporarea acizilor volatili. Se răceşte apoi imediat pe baie de apă cu gheaţă.

Se adaugă 400 ml de apă distilată şi se titrează cu Na_2CO_3 0,2 N în prezenţa fenolftaleinei ca indicator până la apariţia unei coloraţii roz-pal slab dar persistentă.

Calculul rezultatelor. La calcularea rezultatelor se va ţine seama că din volumul de soluţie de carbonat de sodiu introdus în pahar (notat cu $V_{carbonat}$) o parte este consumată pentru neutralizarea acizilor volatili din produsul de analizat (volum notat cu V_{av}), o parte este consumată de dioxidul de carbon din proba de analizat (volum notat cu V_{dioxi}) şi ce rămâne se va titra cu soluţia de acid clorhidric (volum notat cu V_{cHCl}). Deci :

$$V_{carbonat} = V_{av} + V_{dioxi} + V_{cHCl}\ .$$

De aici putem scrie :

$$V_{dioxi} = V_{carbonat} - V_{av} - V_{cHCl}\ .$$

Deoarece reacţiile decurg de la echivalent-gram la echivalent-gram rezultă că :

$$1Eg_{\ Na_2CO_3} \text{ ---------------------------------- } 1\ Eg_{\ CO_2}$$

$$T_{Na_2CO_3} \times V_{dioxi} \text{ ---------------------------------- } A\ g_{\ CO_2}$$

$$A\ g_{\ CO_2} = \frac{T_{Na_2CO_3} \times V_{dioxi} \times Eg_{\ CO_2}}{1Eg_{\ Na_2CO_3}}$$

Înlocuind volumul de soluţie de carbonat corespunzător dioxidului de carbon obţinem:

$$A\ g_{\ CO_2} = \frac{T_{Na_2CO_3} \times (V_{carbonat} - V_{av} - V_{cHCl}) \times Eg_{\ CO_2}}{1Eg_{\ Na_2CO_3}}$$

I.4.5. DOZAREA ACIDULUI ADENOZINTRIFOSFORIC (ATP) ÎN ȚESUTURILE VII

Acidul adenozintrifosforic (ATP) ocupă un loc central în metabolismul substanţelor şi energiei în organismul viu. Importanţa ATP constă în participarea lui la transferul energiei chimice de la reacţiile asociate cu eliberarea ei spre procesele consumatoare de energie.

În celula vie cantitatea principală (95%) de ATP este generată în reacţiile de fosforilare oxidativă şi o parte neînsemnată pe calea fosforilării la nivelul substratului (glicoliza anaerobă, fosforilarea ADP pe seama creatinfosfatului).

Concentraţia ATP în muşchi reprezintă 30 - 45 mg% şi în diferite stări fiziologice poate să se modifice în limite largi. Astfel nivelul ATP scade puternic în oboseala musculară, bolile infecţioase şi inaniţie.

Principiul metodei. ATP se separă din filtratul deproteinizat sub formă de sare de mercur şi se hidrolizează în mediu acid timp de 7 minute la temperatura de 100°C. După cantitatea de fosfor anorganic eliberat în urma hidrolizei ATP se estimează cantitatea acestui compus macroergic în ţesutul analizat. Fosforul anorganic se determină spectrofotometric.

Reactivi. *1) Soluţie de acid tricloracetic 10%.*

2) Soluţie de acetat de mercur 20%.

3) Soluţie de acetat de mercur 0,5%.

4) Soluţie de acid clorhidric 2 N. Se diluează 90 ml soluţie de acid clorhidric concentrat (35 – 37 %) la 500 ml cu apă distilată.

5) Soluţie de acid clorhidric 0,1 N. Se prepară prin amestecarea a 10 ml soluţie de HCl 2 N cu 190 ml apă distilată într-un balon cotat de 200 ml.

6) Soluţie alcoolică de fenolftaleină 0,5%. Se dizolvă 0,25 g de fenolftaleină în 50 ml alcool etilic 70%.

7) Soluţie de hidroxid de sodiu 5 N. Se obţine prin dizolvarea a 20 g NaOH în apă distilată într-un balon cotat de 100 ml.

8) Soluţie de molibdat de amoniu 2,5% în soluţie de acid sulfuric 2,5 N. Se amestecă un volum de soluţie apoasă de molibdat de amoniu 5% cu un volum egal de soluţie de acid sulfuric 5 N.

9) Soluţie de acid ascorbic 0,4%. Se prepară extemporaneu.

10) Soluţie etalon de fosfat monopotasic. Cantitatea de 0,1099 g fosfat monopotasic (KH_2PO_4) se dizolvă în 1000 ml apă bidistilată la balon cotat. 1 ml din această soluţie conţine 0,025 mg fosfor.

Modul de lucru. Un gram de muşchi, ficat, creier etc. se omogenizează sau se triturează cu nisip de cuarţ (sticlă pisată) într-un mojar răcit şi omogenatul obţinut se transferă cu soluţie rece de acid tricloracetic 10% într-o eprubetă gradată de 10 ml. După ce se completează

la semn tot cu soluţie de acid tricloracetic, se amestecă şi se lasă în repaus 40 minute la rece. Proteinele precipitate se separă prin centrifugare la rece, timp de 15 minute, la 3000 rpm .

La 2 ml supernatant se adaugă 0,5 ml soluţie de acetat de mercur 20% şi se agită cu atenţie. Eprubeta se introduce într-o baie de gheaţă timp de 15 minute. Apoi se centrifughează la rece timp de 15 minute, la 3000 rpm. Supernatantul se aruncă, iar precipitatul se spală de două ori cu câte 1 – 2 ml soluţie de acetat de mercur 0,5%. Precipitatul separat după ultima spălare şi centrifugare, se dizolvă într-un ml soluţie de acid clorhidric 0,1N, se completează cu apă distilată la 3 ml şi se amestecă. În două eprubete gradate se măsoară câte 1 ml din amestecul obţinut.

În una din eprubete se pipetează 1 ml soluţie de acid clorhidric 2 N şi se încălzeşte timp de 7 minute într-o baie de apă la fierbere. Eprubeta se răceşte, se introduce în ea o picătură de soluţie de fenolftaleină şi se neutralizează cu soluţie de hidroxid de sodiu 5 N până la apariţia unei culori slab roz.

Cea de a doua eprubetă serveşte la determinarea fosforului anorganic eventual absorbit de precipitatul mercuric.

În ambele eprubete se pipetează câte 1,2 ml soluţie de molibdat de amoniu 2,5% şi 1 ml soluţie de acid ascorbic 0,4%. Se completează volumul cu apă distilată la 10 ml şi se agită. După 20 minute se citeşte extincţia celor două probe faţă de un control cu apă distilată la 700 nm.

Calculul rezultatelor. Conţinutul de fosfor uşor hidrolizabil corespunzător cantităţii de ATP în ţesutul analizat se calculează după formula :

$$mg\ \% = \frac{(a_1 - a_2) \times 10 \times 3 \times 100}{2 \times 1 \times p},$$

unde: a_1 – concentraţia fosforului eliberat în prima eprubetă după hidroliză, găsită pe curba etalon, mg ;

a_2 – concentraţia fosforului în eprubeta a doua, găsită pe curba etalon, mg ;

p – masa ţesutului viu analizat, g .

Concentraţia de fosfor se determină pe curba etalon. Pentru construirea ei într-o serie de eprubete gradate de 10 ml se introduc volume crescânde de soluţie etalon de fosfat monopotasic, conţinând de la 0,0025 mg la 0,075 mg de fosfor. Cu aceste etaloane se efectuează reacţia de culoare pentru fosfor şi se vor citi la un spectrofotometru în mod analog cu probele de cercetat. Valorile extincţiei soluţiilor etalon se utilizează pentru construirea curbei etalon.

II

LUCRĂRI PRACTICE PENTRU BIOCHIMIA LIPIDELOR SIMPLE ȘI COMPLEXE

II.1. DOZAREA LIPIDELOR TOTALE

II.1.1. DOZAREA LIPIDELOR TOTALE ÎN ŢESUTURILE ANIMALE (METODA FOLCH ŞI COLABORATORII, MODIFICATĂ DE I. F. DUMITRU)

Principiul metodei. Lipidele totale sunt extrase din ţesutul animal analizat cu ajutorul unui amestec de cloroform şi alcool metilic. Din extractul lipidic obţinut se îndepărtează impurităţile nelipidice prin spălare cu apă. După uscarea reziduului lipidic se dozează lipidele totale pe cale gravimetrică.

Reactivi. *1) Cloroform p.a.*

2) Alcool metilic (metanol) absolut.

3) Amestec cloroform : metanol (2 : 1).

Modul de lucru. *A) OBŢINEREA EXTRACTULUI LIPIDIC ŞI PURIFICAREA LUI.* Proba de ţesut (ţesut cerebral : 200 - 250 mg ; ficat : 300 - 400 mg ; muşchi : 400 - 500 mg) se triturează într-un mojar cu nisip de cuarţ sau sticlă pisată. Masa omogenă obţinută se trece cantitativ cu 25 ml amestec de cloroform-metanol (2:1) într-o eprubetă cu dimensiunile de 16/180 mm. Eprubeta se închide cu dop de cauciuc şi conţinutul ei se agită energic timp de 10 minute. Apoi conţinutul eprubetei se filtrează, prin hârtie de filtru cantitativă, într-o eprubetă gradată de 25 ml sau într-un balon cotat de 25 ml. Reziduul şi filtrul se spală cu amestec de cloroform-metanol (2:1) până se completează volumul filtratului la 25 ml.

Pentru îndepărtarea impurităţilor nelipidice şi hidrosolubile, într-un pahar Berzelius de 25 (50) ml se măsoară 15 (30) ml apă distilată şi apoi încet şi cu atenţie, se introduc 10 (20) ml de extract lipidic cu pipeta sub stratul de apă, evitându-se agitarea şi amestecarea celor două lichide. Paharul Berzelius este imersat într-un vas care conţine 400 - 500 ml apă distilată. Vasul se acoperă cu o placă de sticlă şi se lasă în repaus timp de 24 de ore. La sfârşitul acestei perioade de timp, în paharul Berzelius se pot observa trei faze distincte :

- faza superioară, limpede, conţinând apă şi metanol, se găseşte direct cu apa din vasul de spălare ;
- faza inferioară, cloroformică, puternic opalescentă ;
- la limitele de separare a celor două faze, o peliculă albă, densă şi unitară care conţine lipide şi lipoproteine.

B) USCAREA EXTRACTULUI LIPIDIC ŞI DOZAREA GRAVIMETRICĂ A LIPIDELOR. Paharul Berzelius este scos din vasul de spălare şi faza superioară se îndepărtează prin sifonare, lăsându-se deasupra peliculei albe un strat de lichid (amestec de apă şi metanol) gros de 2 – 3 mm, evitându-se astfel distrugerea ei. În paharul Berzelius se adaugă cu pipeta 3 – 5 ml de metanol absolut pentru dizolvarea peliculei de lipide şi conţinutul paharului se agită. Dacă pelicula lipidică nu se dizolvă complet, se adaugă metanol, picătură cu picătură, până când soluţia devine perfect transparentă.

După dizolvarea completă a peliculei lipidice conţinutul paharului Berzelius se trece cantitativ, prin spălări repetate cu cantităţi mici de metanol (0,5 – 1 ml), într-o fiolă de cântărire sau într-o capsulă de porţelan (sticlă).

Extractul lipidic se usucă mai întâi la temperatura camerei, timp de 24 de ore, iar apoi în termostat, la temperatura de 50 – 60°C. Uscarea extractului se continuă până la obţinerea, prin cântărirea repetată a fiolei (capsulei), a unei valori constante.

Calculul rezultatelor. Făcând diferenţa dintre greutatea fiolei (capsulei) cântărite cu şi fără reziduu lipidic se află cantitatea de lipide corespunzătoare volumului de extract lipidic utilizat pentru purificarea prin spălare. Cantitatea de lipide totale (X) din ţesutul analizat se exprimă în grame la 100 g de ţesut, conform formulei :

$$X = \frac{a \cdot 25 \cdot 100}{10 \cdot p} \quad \text{sau} \quad X = \frac{a \cdot 50 \cdot 100}{20 \cdot p},$$

unde : 10 sau 20 - volumul (ml) de extract lipidic pipetat sub stratul de apă ;

a – masa reziduului lipidic (g) rămas în fiolă (capsulă) după uscare şi cântărire ;

p – cantitatea de ţesut animal (g) luată pentru dozarea lipidelor.

Importanţa practică. Metoda gravimetrică de dozare a lipidelor totale în ţesuturile animale are o eroare medie de 2 – 3%. Deşi nu este rapidă, metoda se caracterizează prin simplitate tehnică.

Dozarea lipidelor totale în creier, ficat, inimă, muşchi, splină etc., prin metoda Folch în modificarea descrisă, permite obţinerea unei imagini obiective asupra stării funcţionale a organelor menţionate în diferite stări fiziologice şi patologice.

II.1.2. DOZAREA LIPIDELOR TOTALE ÎN SERUL SANGUIN (METODA CU REACTIVUL SULFOFOSFOVANILC)

Principiul metodei. În prezenţa acidului sulfuric concentrat, la cald, lipidele din serul sanguin suferă oxidări degradative cu formarea de cetone care reacţionează cu *vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehida)* şi acidul fosforic dând naştere la compuşi coloraţi violet. Lipidele serice sunt calculate în comparaţie cu un standard cuprinzând o cantitate cunoscută de trioleină.

Reactivi. *1) Acid sulfuric concentrat p.a.*, cu densitatea 1,84.

2) Acid fosforic concentrat p.a., cu densitatea 1,70 – 1,75.

3) Soluţie de vanilină ($C_8H_8O_3$ = 152,1) 40 mM. Se dizolvă 0,6084 g vanilină în 10 – 15 ml apă distilată prin încălzire pe baie de apă. După dizolvarea completă, se răceşte şi se aduce volumul la 100 ml cu apă distilată.

4) Amestec fosfovanilic. Se amestecă 4 volume de acid fosforic concentrat cu un volum de soluţie de vanilină 40 mM.

5) Cloroform c.p.

6) Soluţie standard de trioleină. Se dizolvă 760 mg de trioleină în 100 ml cloroform, la balon cotat. Această soluţie dă o reacţie de culoare de aceeaşi intensitate ca şi cea produsă de serul sanguin ce conţine 1000 mg lipide totale/100 ml. În lipsa trioleinei poate fi folosită drept standard o soluţie de colesterol în cloroform 1000 mg/100 ml.

Modul de lucru. În 3 eprubete uscate se pipetează separat 0,05 ml ser sanguin (probă), 0,05 ml soluţie standard (standard sau etalon) şi respectiv 0,05 ml apă distilată (control). În fiecare eprubetă se adaugă câte 2,5 ml acid sulfuric concentrat şi se agită conţinutul lor. Eprubetele se introduc pentru 10 minute într-o baie de apă la fierbere după care se răcesc imediat, cu apă de robinet, la temperatura camerei.

Din fiecare eprubetă se pipetează câte 0,2 ml amestec de reacţie în alte trei eprubete conţinând câte 4 ml de amestec fosfovanilic. După agitare, eprubetele se lasă la întuneric, timp de 45 minute, la temperatura camerei. Se măsoară extincţia probei (E_p) şi standardului (E_s) faţă de control la 530 nm.

Calculul rezultatelor. Cantitatea lipidelor totale, exprimată în mg lipide/100 ml ser, se poate calcula cu ajutorul formulei :

$$\text{mg lipide totale/100 ml ser} = \frac{E_p}{E_s} \times 1000$$

OBSERVAŢII. 1. Serul sanguin se poate conserva la frigider timp timp de 3 – 6 zile. Se evită utilizarea serului hemolizat.

2. Deoarece acidul sulfuric şi reactivul fosfovanilic au viscozităţi mari, se recomandă adăugarea lor cu biureta.

3. Sticlăria utilizată trebuie bine spălată cu apă distilată şi în final degresată cu alcool etilic pentru a nu conţine urme de lipide. Se recomandă folosirea sticlăriei bine uscată.

Importanța practică. În organismul omului sănătos concentrația lipidelor totale în sânge (*lipidemia*) are valori cuprinse între 600 – 700 mg/100 ml ser şi variază în funcţie de vârstă, sex, alimentaţie, echilibru neuroendocrin, climă, profesie, sarcină etc.

Valori mai mari de 800 – 1000 mg/100 ml ser indică o situaţie patologică. Astfel, în cazul diabetului, alături cu hiperglicemia se observă o hiperlipidemie puternic exprimată (1000 – 2000 mg%). În nefroza lipoidică conţinutul lipidelor totale în sânge poate să atingă valori încă mai ridicate (1000 – 5000 mg%). Hiperlipidemia se mai întâlneşte, de asemenea, în ciroză, hepatitele acute, nefrite, obezitate, hipotiroidie, pancreatită, ateroscleroză etc.

Hipolipidemia este un simptom al necrozei hepatice avansate, al hipertiroidismului, al stărilor de malabsorbţie.

Dozarea lipidelor totale în serul sanguin este utilizată ca un test de triere (screening) pentru a depista dislipidemiile.

II.2. ANALIZA TRIACILGLICEROLILOR

Triacilglicerolii sau trigliceridele sau grăsimile neutre sunt larg răspândite în animale şi plante. În celulele animale şi vegetale există triacilgliceroli de rezervă şi triacilgliceroli protoplasmatici. Ultimii reprezentând o parte componentă a protoplasmei au o compoziţie constantă şi nu sunt catabolizaţi nici în cazul că organismului îi lipseşte hrana.

Triacilglicerolii de rezervă se acumulează în cantitate mare în seminţele şi fructele diferitelor specii de plante spontane şi cultivate. Unele plante de cultură (floarea soarelui, rapiţa, soia etc.) servesc adesea ca materie primă pentru obţinerea triacilglicerolilor vegetali, numiţi şi uleiuri.

Triacilglicerolii se diferenţiază după proprietăţile lor care sunt concretizate într-o serie de constante, precum indicele de aciditate, indicele de saponificare, indicele de iod, indicele peroxidic.

Analiza triaciglicerolilor cuprinde determinarea conţinutului lor în organele plantelor sau în ţesuturile animalelor şi stabilirea constantelor specifice unui triacilglicerol dat.

II.2.1. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A TRIACILGLICEROLILOR ÎN PLANTE

Metodele de determinare a conţinutului de triacilgliceroli în plante se bazează mai ales pe proprietatea acestora de se dizolva în diferiţi solvenţi organici. Triacilglicerolii se extrag complet din materialul vegetal cercetat cu ajutorul unui solvent adecvat şi se determină pe cale gravimetrică după evaporarea extractului la sec sau se calculează în funcţie de greutatea probei degresate.

II.2.1.1. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A TRIACILGLICEROLILOR ÎN PLANTE (METODA SOXHLET INDIRECTĂ)

Principiul metodei. Triacilglicerolii se extrag la cald din materialul de provenienţă vegetală cu ajutorul unui solvent organic (eter etilic, eter de petrol, cloroform, dicloretan etc.). După greutatea probei degresate se calculează cantitatea de triacilgliceroli în materialul analizat.

Pentru extracţie se foloseşte aparatul de tip Soxhlet care este format din trei părţi demontabile:

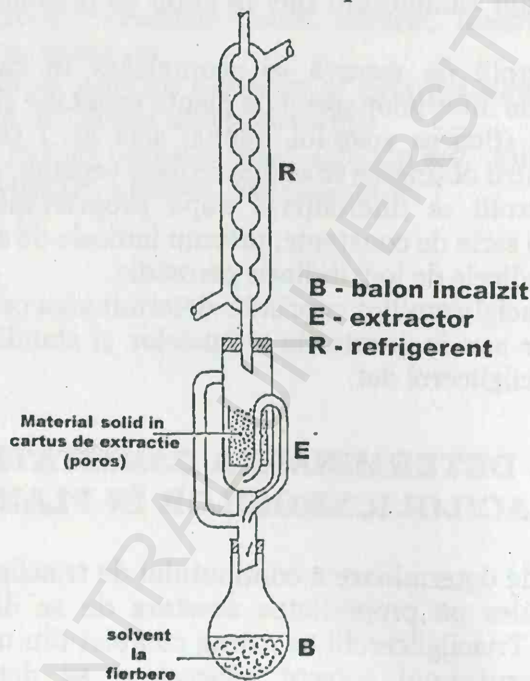
- balonul termorezistent cu şlif A, în care se încălzeşte solventul şi se colectează extractul;

- extractorul B cu şlifuri la ambele extremităţi, în care se introduce într-un plic de hârtie de filtru materialul de extras. Extractorul B este prevăzut cu două tuburi laterale de sticlă: un tub mai larg 1, pentru trecerea vaporilor de solvent din balonul A în partea superioară a aparatului şi un tub subţire 2, care serveşte la sifonarea extractului din extractorul B în balonul A;

- refrigerentul cu reflux D prevăzut cu bule.

Încălzirea aparatului se face pe o baie de apă electrică din cauza inflamabilităţii solventului organic.

Reactivi. *1) Eter etilic* sau *eter de petrol.*



Aparatul SOXHLET

Modul de lucru. Într-un plic de hârtie de filtru, în prealabil uscat la 105°C şi cântărit într-o fiolă închisă, se cântăresc la balanţa analitică 1 – 2 g de material vegetal, uscat şi fin măcinat.

Plicul se închide şi se usucă în la 105°C până la pondere constantă. Apoi, plicul cu proba de cercetat se introduce în extractorul aparatului Soxhlet şi se extrage cu eter etilic timp de 3 – 5 ore. Se potriveşte intensitatea fierberii solventului în balonul A în aşa fel încât să se realizeze 4 – 5 sifonări pe oră. După terminarea extracţiei, se scoate plicul din aparat şi se lasă 20 – 40 minute pe o sticlă de ceas până la evaporarea celei mai mari părţi din eterul cu care este îmbibată hârtia. Apoi, plicul se introduce în fiola folosită iniţial la cântărire şi se usucă timp de 1 oră într-o etuvă la

105°C. Fiola conţinând plicul cu materialul degresat se răceşte în exicator şi se cântăreşte la balanţa analitică.

Calculul rezultatelor. Cantitatea triacilglicerolilor în proba cercetată se află prin diferenţa dintre greutatea iniţială a plicului cu materialul vegetal şi greutatea lui finală.

Conţinutul procentual de triacilgliceroli (X%) în 100 g substanţa uscată se găseşte după formula:

$$X\% = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100,$$

în care: m_1 – masa plicului cu materialul vegetal supus extracţiei, după uscare, în g;

m_2 – masa plicului cu materialul degresat, după uscare, în g;

m - masa materialului analizat după uscare, în g.

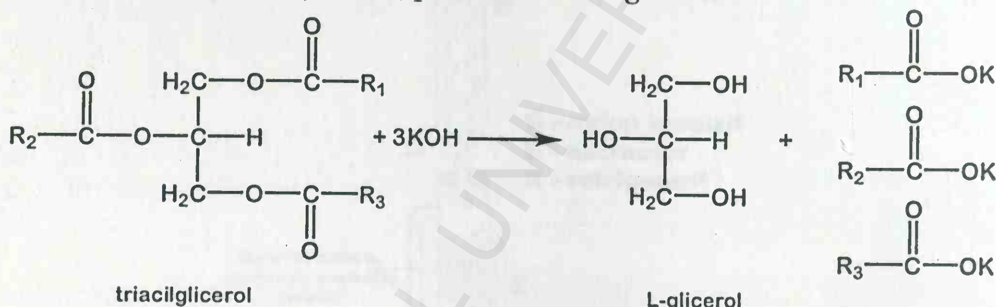
Metoda prezintă avantajul că se pot introduce simultan mai multe probe în acelaşi aparat Soxhlet. Gradul de eroare al metodei este de 0,5 – 0,7%.

II.2.2. DOZAREA TRIACILGLICEROLILOR ÎN SERUL SANGUIN (METODA TIXIER ŞI CLAUDE)

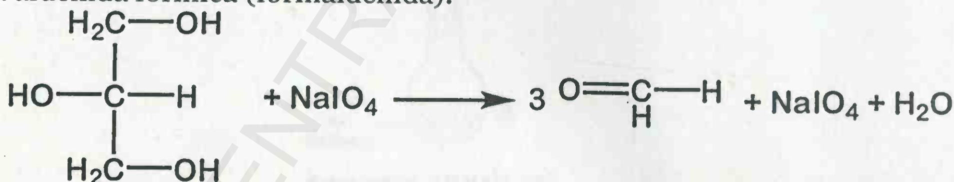
Triacilglicerolii (trigliceridele) sunt lipide simple, reprezentând esteri ai glicerolului cu diferiţi acizi graşi saturaţi sau nesaturaţi.

Triacilglicerolii constituie aproximativ 95% din lipidele ţesutului adipos. Conţinutul de triacilgliceroli din alte ţesuturi este însă mai mic, cu excepţia celulelor intestinale unde aceste lipide se sintetizează în urma digestiei şi absorbţiei triacilglicerolilor din hrană. Principalele organe furnizoare de triacilgliceroli sunt ţesutul adipos şi ficatul. Rolul primordial al triacilglicerolilor este cel energetic, deoarece prin lipoliză eliberează acizii graşi care sunt oxidaţi în mitocondrii cu producere de energie.

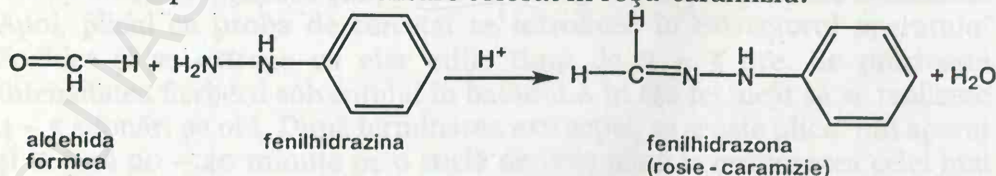
Principiul metodei. Triacilglicerolii din serul sanguin, prin saponificare în prezenţa KOH, pun în libertate glicerol:



Glicerolul astfel rezultat este oxidat sub acţiunea acidului periodic la aldehidă formică (formaldehidă):



Aldehida formică reacţionează cu fenilhidrazina în mediu acid, formând un produs de condensare colorat în roşu-cărămiziu:



Intensitatea coloraţiei obţinute, estimată spectrofotometric, este proporţională cu concentraţia triacilglicerolilor serici.

Reactivi. *1) Soluţie de hidroxid de potasiu (KOH) 4% în alcool etilic absolut.*

2) Soluţie de sulfat de magneziu ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 3,7%.

3) Soluţie de acid sulfuric (H_2SO_4) 2 N. Într-un balon cotat de 250 ml conţinând circa 200 ml apă distilată se adaugă cu atenţie, în volume mici, 15 ml soluţie de acid sulfuric concentrat (94 – 96%). După răcirea amestecului la temperatura camerei, se completează cu apă distilată la 250 ml.

4) Soluţie de metaperiodat de sodiu 0,1 M. Se prepară extemporaneu prin dizolvarea a 0,2139 g metaperiodat de sodiu ($NaIO_4$) în 10 ml apă distilată.

5) Soluţie de clorhidrat de fenilhidrazină (C_6H_5- NH-NH_2.HCl) 4%. Soluţia se prepară extemporaneu.

6) Soluţie de acid clorhidric (HCl) 5 N. La 275 ml apă distilată se adaugă 225 ml de acid clorhidric concentrat.

7) Soluţie etalon de tripalmitină ($C_{51}H_{98}O_6$) sau trioleină ($C_{57}H_{104}O_6$) 100 mg%. Se dizolvă 100 mg tripalmitină sau trioleină în 100 ml cloroform.

Modul de lucru. *A) SAPONIFICAREA TRIACILGLICEROLILOR.* Pentru saponificarea triacilglicerolilor, într-o eprubetă de centrifugă (proba) se măsoară 0,1 ml ser sanguin; într-o altă eprubetă de centrifugă (etalon) se măsoară 0,1 ml soluţie etalon de tripalmitină sau trioleină şi în a treia eprubetă (control) – 0,1 ml apă distilată. În fiecare eprubetă se adaugă câte 0,5 ml soluţie alcoolică de KOH.

Eprubetele se introduc într-o baie de apă sau într-un termostat la 37°C timp de 60 minute sau la 60°C timp de 30 minute. După răcire, în fiecare eprubetă se adaugă 1 ml soluţie de sulfat de magneziu şi 3 ml apă distilată. Se agită, iar precipitatul de $Mg(OH)_2$ format, care înglobează proteinele şi săpunurile acizilor graşi, este îndepărtat prin centrifugare timp de 15 minute la 3000 rot./min.

În paralel cu proba, etalonul şi controlul, se efectuează un martor pentru glicerolul liber din ser. În acest scop, într-o eprubetă de centrifugă se măsoară 0,1 ml ser, 1 ml soluţie de sulfat de magneziu, 3 ml apă distilată şi 0,5 ml soluţie alcoolică de KOH. Mai departe se procedează identic cu primele trei eprubete.

B) DOZAREA GLICEROLULUI. În supernatantul deproteinizat obţinut după centrifugare se dozează glicerolul, conform următorului tabel:

Reactiv	Probă	Etalon	Martor	Control
Supernatant (ml)	1	1	1	1
Soluţie de acid sulfuric 2 N (ml)	1	1	1	1
Soluţie de metaperiodat de sodiu (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2
Se agită şi se lasă în repaus, la întuneric, timp de 10 minute				

Reactiv	Probă	Etalon	Martor	Control
Soluție clorhidrat de fenilhidrazină (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Se lasă în repaus, la întuneric, timp de 10 minute				
Soluție de acid clorhidric 5 N (ml)	2	2	2	2

După 15 minute (până la maxim 30 minute) de la adăugarea soluției de HCl, timp în care se dezvoltă culoarea, probele se vor citi la un spectrofotometru, determinându-se extincțiile probei (E_p), etalonului (E_{et}) și martorului (E_{mar}) la λ =530 nm, față de controlul reactivilor (eprubeta cu 0,1 ml apă distilată).

Calculul rezultatelor. Pentru a determina cantitatea de triacilgliceroli, se scade extincția martorului (glicerolul liber) din extincția probei. Deci:

$$\text{mg triacilgliceroli / 100 ml ser} = \frac{E_p - E_{mar}}{E_{et}} \times 100$$

, unde:

E_p – extincția probei;
E_{mar} -extincția martorului;
E_{et} – extincția etalonului.

OBSERVAȚIE. În cazul serurilor hiperlipemice lactescente este recomandabil ca acestea să se dilueze 1: 1 cu ser fiziologic.

Valori fiziopatologice. Conținutul de triacilgliceroli în serul sanguin depinde de specia de mamifere.

În cazul omului, valorile fiziologice normale sunt cuprinse între 40 – 150 mg % sau 0,45 – 1,69 mmoli / L. Conversia mg % în mmoli / L se face după formula mmoli/L = mg % x 0,0113.

Concentrația triacilglicerolilor serici crește (*hipertriacilglicerolemie*) în tulburări ale metabolismului lipidic, ca hiperlipemia esențială și hiperlipoproteinemia primară (familială). Se consideră că dozarea triacilglicerolilor în serul sanguin este unul din indicatorii principali pentru precizarea diagnosticului diferitelor anomalii congenitale ale metabolismului lipidic.

Creșterea simptomatică a nivelului triacilglicerolilor serici se observă în graviditate, diabet, pancreatită, sindromul nefrotic, hipotiroidie, infiltrația grasă și alte afecțiuni ale ficatului, ateroscleroză, boli cardiovasculare.

II.2.3. DETERMINAREA INDICELUI DE ACIDITATE

Indicele de aciditate defineşte aciditatea triacilglicerolului şi se exprimă prin numărul miligramelor de hidroxid de potasiu necesar pentru neutralizarea acizilor graşi liberi conţinuţi înt-un gram de triacilglicerol.

Indicele de aciditate, alături cu alţi indicatori fizico-chimici, caracterizează calitatea triacilglicerolilor. De exemplu, dacă un triacilglicerol vegetal (uleiul de floarea soarelui, uleiul de soia, uleiul de rapiţă etc.) este obţinut din seminţe ajunse la maturitate biologică (coapte) atunci va conţine o cantitate mică de acizi graşi liberi. În uleiul obţinut din seminţe necoapte conţinutul acizilor graşi liberi este însemnat. Prin păstrarea (depozitarea) uleiurilor se observă hidroliza triacilglicerolilor care conduce la acumularea acizilor graşi liberi, deci la creşterea acidităţii. Un ulei cu aciditate ridicată nu este de calitate bună.

Principiul metodei. Metoda de determinare a indicelui de aciditate se bazează pe titrarea acizilor graşi liberi existenţi în ulei cu o soluţie de hidroxid de potasiu 0,05 N. Se foloseşte soluţia de KOH şi nu de NaOH, întrucât săpunurile de potasiu care se formează sunt mai solubile în condiţiile experimentului.

Reactivi. *1) Amestec alcool etilic – eter etilic (1: 1).* Amestecul de etanol-eter se neutralizează prin adăugarea cu picătura a soluţiei alcoolice de KOH, în prezenţa a 3-4 picături de soluţie de fenolftaleină 1% până la apariţia unei culori slab roz.

2) Soluţie de hidroxid de potasiu 0,05 N în alcool etilic 96%. Se dizolvă 2,8055 g KOH într-o cantitate minimă de apă distilată. Se adaugă alcool etilic 96 % până la volumul de 1000 ml. Se lasă în repaus 3 zile pentru a se depune carbonatul de potasiu. Se filtrează şi apoi se stabileşte factorul soluţiei de KOH folosind acidul oxalic. Soluţia de KOH se păstrează în flacon brun, închis bine pentru a se evita dioxidul de carbon din aer.

3) Soluţie de fenolftaleină 1%. Se dizolvă 0,1 g de fenolftaleină în 10 ml alcool etilic 96%.

Modul de lucru. O cantitate de 2 – 3 g ulei vegetal sau triacilglicerol animal, cântărite la balanţa analitică prin diferenţă într-o fiolă de cântărire, se introduc într-un flacon conic de 100 ml cu gâtul larg. În flacon se măsoară 10 – 15 ml amestec neutru de etanol-eter, utilizând un cilindru gradat. După dizolvarea uleiului sau triacilglicerolului animal se adaugă 1 – 2 picături de soluţie de fenolftaleină 1% şi se titrează cu soluţie alcoolică de KOH până la apariţia unei culori slab roz care să persiste 30 – 60 secunde.

Calculul rezultatelor. Indicele de aciditate se calculează cu ajutorul formulei:

$$\text{Indice de aciditate} = \frac{V \times F \times 2,8055}{a},$$

unde: V – volumul (în ml) soluţiei alcoolice de KOH 0,05 N consumat la titrarea cantităţii de triacilglicerol cântărit;

F – factorul soluţiei de KOH 0,05 N;

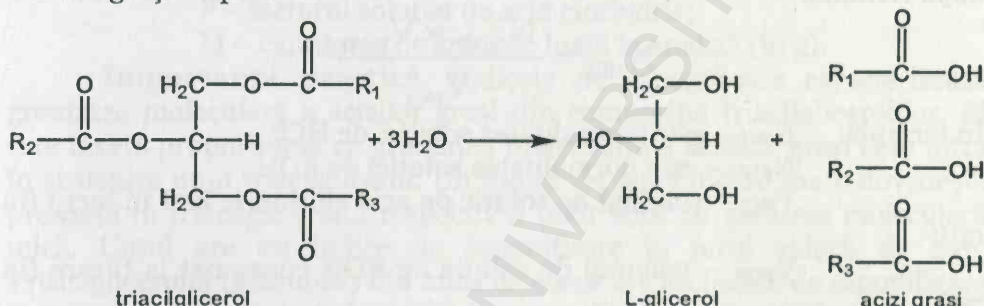
2,8055 – numărul mg de KOH corespunzătoare unui ml soluţie exact 0,05 N;

a - cantitatea de ulei vegetal sau triacilglicerol animal, în g.

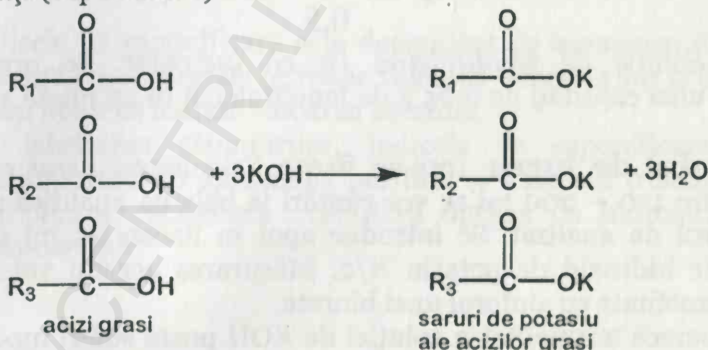
II. 2.4. DETERMINAREA INDICELUI DE SAPONIFICARE

Indicele de saponificare reprezintă numărul de miligrame de hidroxid de potasiu necesare pentru neutralizarea acizilor graşi eliberaţi prin saponificarea unui gram de triacilgliceroli.

Principiul metodei. O anumită cantitate de triacilgliceroli, exact cântărită la a patra zecimală, se fierbe într-un flacon Erlenmeyer cu refrigerent ascendent în prezenţa unui volum determinat de soluţie de KOH de titru cunoscut. În aceste condiţii are loc hidroliza legăturilor ester din molecula triacilglicerolului cu punerea în libertate a glicerolului şi acizilor graşi respectivi:



Acizii graşi eliberaţi în urma hidrolizei triacilglicerolului neutralizează o parte din hidroxidul de potasiu, cu formarea sărurilor acizilor graşi (săpunurilor):



Excesul de KOH va fi retitrat cu o soluţie de acid clorhidric (HCl) de titru cunoscut, în prezenţa fenolftaleinei ca indicator:



Prin diferenţă între cantitatea iniţială şi cea finală de hidroxid de potasiu se va afla cantitatea de hidroxid de potasiu care a fost necesară la neutralizarea acizilor graşi. Se poate astfel calcula apoi indicele de saponificare.

Reactivi. *1) Soluţie de hidroxid de potasiu N/2 (0,5 N) în alcool etilic 96%.* Se prepară prin dizolvarea a 30 g de KOH într-un volum minim

(25 ml) de apă distilată. Se adaugă apoi alcool etilic 96% până la un volum de 1000 ml. Se lasă câteva zile pentru depunerea carbonatului de potasiu, apoi se filtrează şi se stabileşte factorul soluţiei de hidroxid de potasiu cu ajutorul acidului oxalic.

Soluţia de hidroxid de potasiu va fi păstrată în sticlă brună, ermetic închisă pentru a fi ferită de contactul cu CO_2 din atmosferă.

2) Soluţie de acid clorhidric N/2 (0,5 N). Se prepară prin diluarea într-un balon cotat de 1000 ml a 45 ml de acid clorhidric concentrat cu apă distilată. Factorul soluţiei de acid clorhidric se stabileşte cu ajutorul soluţiei titrate de KOH în etanol. Un volum de 20 – 25 ml de acid clorhidric (măsurat exact cu ajutorul unei biurete) este titrat în prezenţă de fenolftaleină cu soluţie alcoolică de KOH până se obţine o culoare foarte slab roz persistentă. Normalitatea exactă a soluţiei de HCl se va calcula după formula:

$$N_{HCl} = \frac{N_{KOH} \times V_{KOH}}{V_{HCl}}$$

În formulă: N_{HCl} – este normalitatea soluţiei de HCl;
N_{KOH} – este normalitatea soluţiei de KOH;
V_{HCl} – volumul de soluţie de acid clorhidric luat în lucru (în ml);
V_{KOH} – volumul de soluţie de KOH consumat la titrare (în ml).

Factorul soluţiei de HCl va fi dat de formula:

$$F = \frac{N_{HCl}}{0,5}$$

3) Soluţie de fenolftaleină 1% ca indicator. Se prepară prin dizolvarea unei cantităţi de 0,25 g de fenolftaleină în 25 ml de alcool etilic 96%.

Modul de lucru. Într-un flacon Erlenmeyer uscat cu volumul cuprins între 150 – 200 ml se vor cântări la balanţa analitică 1 – 2 g de triacilglicerol de analizat. Se introduc apoi în flacon 25 ml din soluţia alcoolică de hidroxid de potasiu N/2. Măsurarea acestui volum trebuie făcută cu exactitate cu ajutorul unei biurete.

Deoarece normalitatea soluţiei de KOH poate suferi modificări, fie din cauza oxidării alcoolului etilic, fie din cauza carbonatării hidroxidului de potasiu, se recomandă verificarea normalităţii soluţiei de KOH. În acest scop paralel cu proba cu triacilglicerol se efectuează un control în care triacilglicerolul este înlocuit cu 2 ml de apă distilată.

Ambelor flacoane li se vor monta refrigerente ascendente şi vor fi supuse fierberii timp de 30 de minute pe o baie de apă. Conţinutul flacoanelor se va agita cu grijă din 10 în 10 minute. Saponificarea se consideră terminată când conţinutul flaconului cu triacilglicerol devine clar.

După terminarea saponificării şi răcirea flacoanelor se adaugă câte 2-3 picături de soluţie alcoolică de fenolftaleină şi se titrează excesul de KOH cu soluţie de acid clorhidric N/2 până dispare complet coloraţia roz a conţinutului din fiecare flacon.

Calculul rezultatelor. Un mililitru de soluţie de acid clorhidric exact 0,5N corespunde la 28,055 mg de hidroxid de potasiu. Indicele de saponificare (IS) se va calcula după formula:

$$IS = \frac{(V - v) \times F \times 28{,}055}{M}$$

În formulă: V – volumul de soluţie de acid clorhidric utilizat la titrarea controlului (în ml);

v – volumul de soluţie de acid clorhidric necesar la titrarea excesului de KOH în proba cu triacilglicerol (în ml);

F – factorul soluţiei de acid clorhidric;

M – cantitatea de grăsime luată în analiză (în g).

Importanţa practică. Indicele de saponificare caracterizează greutatea moleculară a acizilor graşi din compoziţia triacilglicerolilor. El este invers proporţional cu greutatea moleculară a acizilor graşi care intră în structura unui triacilglicerol. Un indice de saponificare mare dovedeşte prezenţa în triacilglicerolul respectiv a unor acizi cu greutate moleculară mică. Untul are un indice de saponificare în jurul valorii de 226. Triacilglicerolul (grăsimea) din nuca de cocos are un indice de saponificare cuprins între 245 – 246. Indicele de saponificare mic implică prezenţa în triacilglicerolul analizat a unor acizi graşi cu greutate moleculară mare cum este cazul uleiului de rapiţă ce are un indice de saponificare cuprins între 172 şi 174.

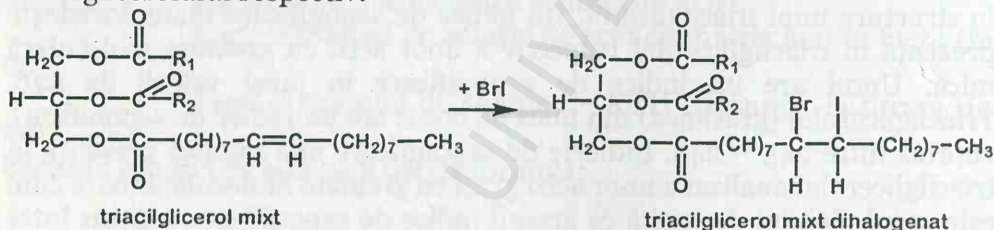
Indicele de saponificare este dependent de asemenea de prezenţa unor substanţe saponificabile ce reduc valoarea indicelui dar şi de prezenţa acizilor graşi liberi ce măresc valoarea acestuia.

La fabricarea săpunurilor, indicele de saponificare este un parametru important în aprecierea purităţii şi a naturii triacilglicerolilor, precum şi pentru stabilirea cantităţii optime de hidroxid de sodiu necesară procesului.

II.2.5. DETERMINAREA INDICELUI DE IOD (METODA HANUS)

Indicele de iod reprezintă cantitatea de iod, exprimată în grame, care este adiționată la legăturile duble ale acizilor grași nesaturați din 100 g de triacilglicerol. Noțiunea de indice de iod este convențională deoarece majoritatea metodelor de determinarea a acestui parametru nu utilizează numai iodul ca agent de halogenare. Principalele metode folosesc ICl, BrI, HOI, Br_2. Indiferent de natura compusului halogenat utilizat, se calculează cantitatea de iod, exprimată în grame, echivalentă cantității de halogen adiționat la 100 g de triacilglicerol.

Principiul metodei. Prin amestecarea soluției de iod în acid acetic glacial cu bromul se formează bromura de iod. Triacilglicerolul dizolvat în cloroform este tratat, la întuneric, cu un exces de soluție acetică de bromură de iod. În aceste condiții bromura de iod se adiționează cantitativ la legăturile duble ale acizilor grași nesaturați din compoziția triacilglicerolului respectiv:



triacilglicerol mixt — triacilglicerol mixt dihalogenat

Excesul de bromură de iod este descompus de iodura de potasiu (KI) care sa adaugă după ce probele au stat la întuneric:



$$BrI + KI \longrightarrow KBr + I_2$$

Iodul rezultat se titrează cu soluție de tiosulfat de sodiu, în prezența amidonului ca indicator:



$$I_2 + Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6$$

Reactivi. *1) Cloroform p.a.*

2) Soluție Hanus. Se prepară prin dizolvarea a 3,25 g de iod metalic în 25 ml de soluție de acid acetic glacial într-un balon cotat de 250 ml. În soluția rezultată se adaugă 2,05 g de brom și volumul va fi completat la semn cu acid acetic glacial. Reactivul se va păstra la întuneric în sticlă brună cu dop rodat. ***ATENȚIE LA MANIPULAREA BROMULUI! SE VA LUCRA LA NIȘĂ !***

3) Soluție de iodură de potasiu 10%.

4) Soluție de amidon 1% (vezi Reactiv 4 la *Lucrarea I.1.1*).

5) Soluție de tiosulfat de sodiu 0,1N. Într-un balon cotat de 1000 ml, se dizolvă 25 g de tiosulfat de sodiu în 700 ml de apă distilată, în prealabil fiartă pentru îndepărtarea CO_2. În vederea conservării soluției de

tiosulfat, în flacon se adaugă 0,1 g de carbonat de sodiu şi se completează la semn, tot cu apă distilată fiartă. Soluţia de tiosulfat se lasă în repaus 2-3 zile. Apoi se stabileşte factorul soluţiei de tiosulfat cu ajutorul dicromatului de potasiu. Se dizolvă 0,3866 g de dicromat de potasiu în 100 ml apă distilată. Într-un flacon conic de 150-200 ml se măsoară 20 ml soluţie de dicromat de potasiu, 10 ml soluţie iodură de potasiu 10%, 5 ml acid clorhidric concentrat şi iodul rezultat se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu, în prezenţa amidonului ca indicator. Se calculează factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu 0,1 N.

Modul de lucru. Se vor cântări 0,2 – 0,4 g de triacilglicerol vegetal (ulei) sau 0,8 – 1 g de triacilglicerol de provenienţă animală într-o fiolă de cântărire, în care se găseşte şi o mică pipetă cu lungimea de circa 5 cm. Cu ajutorul pipetei triacilglicerolul din fiolă de cântărire va fi trecut într-un vas Erlenmeyer de 300 ml (cu dop rodat, perfect curat şi uscat). Se recântăreşte fiola împreună cu pipeta. Diferenţa dintre prima şi cea de a doua cântărire reprezintă cantitatea de triacilglicerol luată pentru determinare. În vasul Erlenmeyer se adaugă 10 ml cloroform.

În alt vas Erlenmeyer, ce va servi de control, vor fi introduşi numai 10 ml de cloroform.

Apoi, atât în probă cât şi în control se va introduce dintr-o biuretă exact câte 15 (20 sau 25) ml de soluţie Hanus. Vasele se închid cu dopul rodat. Conţinutul vaselor se agită cu atenţie şi se lasă la întuneric timp de 1 oră la temperatura de 25 – 30°C sau la temperatura camerei până la 2 ore.

La finalul acestui interval se adaugă în fiecare vas câte 15 ml de soluţie de iodură de potasiu şi 50 ml de apă distilată. Conţinutul se agită energic şi se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu până la apariţia unei coloraţii galben – portocalii. Se adaugă apoi 1 – 2 picături de soluţie de amidon şi se continuă titrarea până la completa dispariţie a coloraţiei albastru închis a complexului format între iod şi amidon.

Calculul rezultatelor. La 1 ml de soluţie de tiosulfat de sodiu exact 0,1N corespund 0,0127g de iod. Indicele de iod (I.i.) se va calcula după formula:

$$I.i. = \frac{(V-v) \times F \times 0,0127 \times 100}{G}$$

În formulă: V – volumul de soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N utilizat la titrarea controlului (în ml) ;

v – volumul de soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N consumat la titrarea probei (în ml);

F – factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu 0,1 N;

G – cantitatea de grăsime luată pentru analiză (în g).

Importanţa practică. Din punct de vedere practic indicele de iod este important pentru a stabili conţinutul în acizi graşi nesaturaţi al unui triacilglicerol dat. Totodată, indicele de iod permite aprecierea gradului de sicativitate al unui triacilglicerol, tendinţa acestuia de a râncezi, precum şi

prezicerea comportamentului acelui triacilglicerol în timpul stocării sau al prelucrării.

În cazul uleiurilor proaspete indicele de iod este o constantă caracteristică care poate fi utilizată în a determina proveniența lor. După valoarea indicelui de iod uleiurile naturale por fi împărțite în uleiuri sicative, semisicative şi nesicative. Uleiurile sicative au indicele de iod cu o valoare peste 130 (indicele de iod al uleiului de in este cuprins între 170 şi 180). Uleiurile semisicative au indicele de iod cuprins între 95 şi 130 (în cazul uleiului de floarea soarelui indicele de iod oscilează între 127 – 136). Uleiurile nesicative au indici de iod sub 90 (uleiul de măsline are indicele de iod sub 90). Triacilglicerolii animalelor terestre au un indice de iod mai mic, în general sub 80 iar la animalele marine acesta este cuprins între 100 şi 170.

Determinarea indicelui de iod se practică curent în industrie pentru a aprecia puritatea şi natura triacilglicerolilor utilizaţi în procesul de producţie. Este un indicator important în industria de preparare a margarinelor.

II.2.6. METODE DE DETERMINARE A UNOR PRODUŞI REZULTAŢI ÎN OXIDAREA PEROXIDICĂ A LIPIDELOR ÎN ORGANISMELE VII

Numeroase stări patologice (ateroscleroză, diabet zaharat, insuficienţă hepatică, fibroză pulmonară, poliartrită reumatoidă, insuficienţă renală, cancer, boli degenerative etc.), întâlnite la om şi animale, sunt asociate cu aşa-numitul **stres oxidativ** în care se observă producerea de specii reactive ale oxigenului şi acumularea produşilor oxidării peroxidice a lipidelor în ţesuturile vii.

Speciile reactive ale oxigenului sunt reprezentate de: anionul superoxid ($O_2^{\bullet -}$), peroxidul de hidrogen sau apa oxigenată (H_2O_2), radicalul hidroxil (HO^*) şi oxigenul singlet ($^1O_2$).

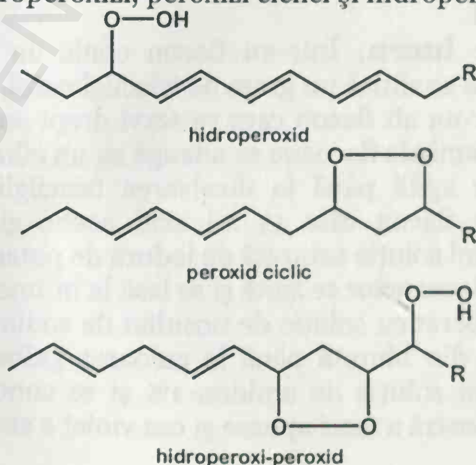
Între produşii de oxidare peroxidică a lipidelor se numără radicalul lipid peroxil ($R\text{-}O\text{-}O^\bullet$), lipid hidroperoxidul (R-O-O-H) şi radicalul lipid alcoxil ($R\text{-}O^\bullet$).

Prezenţa speciilor reactive ale oxigenului şi a produşilor de oxidare peroxidică a lipidelor în celula vie atrage după sine dereglarea activităţii multor sisteme enzimatice.

O imagine asupra oxidării peroxidice a lipidelor în ţesuturile animale este oferită de determinarea indicelui peroxidic, determinarea conjugării dienice (care apare în primele etape ale oxidării peroxidice), determinarea dialdehidei malonice care constituie unul din cei mai importanţi produşi finali ai oxidării peroxidice a lipidelor etc.

II.2.6.1. DETERMINAREA INDICELUI PEROXIDIC

În prezenţa oxigenului atmosferic acizii graşi nesaturaţi cu mai mult de două duble legături din compoziţia triacilglicerolilor se pot oxida parţial cu formarea de hidroperoxizi, peroxizi ciclici şi hidroperoxi - peroxizi:



Procesul de peroxidare este iniţiat de un radical liber, gruparea cea mai vulnerabilă la acest atac radicalic fiind gruparea $-CH_2-$ din imediata vecinătate a dublelor legături. Reacţia se propagă în lanţ. Peroxizii formaţi exercită acţiuni oxidante, degradative asupra resturilor de acizi graşi din molecula triacilglicerolilor, rezultând acizi inferiori, aldehide, cetone.

Formarea peroxizilor se observă în procesul de râncezire a triacilglicerolilor. În acest mod indicele peroxidic serveşte ca indicator al schimbărilor oxidative suferite de triacilgliceroli prin învechire sau expunere la lumină, aer, ioni metalici.

De obicei, indicele peroxidic se exprimă în grame de iod care pot să reacţioneze cu peroxizii conţinuţi în 100 grame de triacilglicerol.

Principiul metodei. Determinarea indicelui peroxidic se bazează pe proprietatea peroxizilor formaţi de acizii graşi din triacilglicerolul analizat de a reacţiona în mediu acid cu iodura de potasiu (KI), punând în libertate iodul (I_2):





Iodul rezultat în reacţia de mai sus se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu, în prezenţa amidonului ca indicator:



După cantitatea soluţiei de tiosulfat consumată pentru fixarea iodului eliberat, se calculează indicele peroxidic.

Reactivi. *1) Cloroform.*

2) Acid acetic glacial.

3) Soluţie saturată de iodură de potasiu (KCl). Se prepară în momentul utilizării.

4) Soluţie de amidon 1%. (vezi Reactiv 4, *Lucrarea I.1.1*).

5) Soluţie de tiosulfat de sodiu 0,01 N. Se diluează 100 ml soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1 N (vezi Reactiv 5, *Lucrarea II.2.5*) cu apă distilată la volumul de 1000 ml.

Modul de lucru. Într-un flacon conic de 100 – 150 ml se cântăreşte la balanţa analitică un gram de triacilglicerol, cu o exactitate la a patra zecimală. Într-un alt flacon care va servi drept control se măsoară 2 ml apă distilată. În ambele flacoane se adaugă cu un cilindru gradat câte 10 ml cloroform şi se agită până la dizolvarea triacilglicerolului. Apoi se introduc în fiecare flacon câte 15 ml acid acetic glacial (folosind un cilindru) şi câte un ml soluţie saturată de iodură de potasiu (cu o pipetă).

Conţinutul flacoanelor se agită şi se lasă la întuneric. După 3 minute se titrează iodul eliberat cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,01 N. Se adaugă soluţie de tiosulfat din biuretă până la culoarea galben, se pipetează în fiecare flacon un ml soluţie de amidon 1% şi se continuă titrarea până dispare culoarea albastră a fazei apoase şi cea violet a stratului cloroformic.

Calculul rezultatelor. Indicele peroxidic al triacilglicerolului cercetat se calculează cu ajutorul formulei:

$$I.P. = \frac{(V - v) . F . 0,00127 . 100}{G}$$

unde: V – ml soluţie de tiosulfat 0,01 N consumaţi la titrarea probei cu triacilglicerol;

v – ml soluţie de tiosulfat 0,01 N consumaţi la titrarea controlului;

F – factorul soluţiei de tiosulfat de sodiu;

0,00127 – cantitatea gramelor de iod echivalentă pentru un ml soluţie de tiosulfat de sodiu exact 0,01 N;

G – greutatea triacilglicerolului analizat.

Aprecierea gradului de alterare oxidativă a triacilglicerolului în funcţie de valoarea indicelui peroxidic este dată mai jos:

Indice peroxidic, % iod	**Gradul de alterare**
Mai mic de 0,03	Triacilglicerol proaspăt
0,03 – 0,06	Triacilglicerol proaspăt, însă nu se pretează la păstrare
0,06 – 0,10	Triacilglicerol cu prospeţime dubioasă
Mai mare de 0,1	Triacilglicerol alterat

II.2.6.2. DETERMINAREA SPECTROFOTOMETRICĂ A CONJUGĂRII DIENICE A ACIZILOR GRAŞI SUPERIORI NESATURAŢI (METODA I. D. STALINAJA)

Principiul metodei. În timpul oxidării peroxidice în etapa de formare a radicalilor liberi în moleculele acizilor graşi superiori polinesaturaţi apare un sistem de conjugare a legăturilor duble, care dă naştere la un nou maxim în spectru de absorbţie, localizat la λ_{max}=233 nm .

Reactivi. *1) Heptan normal.*

2) Alcool izopropilic.

3) Soluţie de clorură de potasiu (KCl) 0,9 %.

4) Alcool etilic absolut.

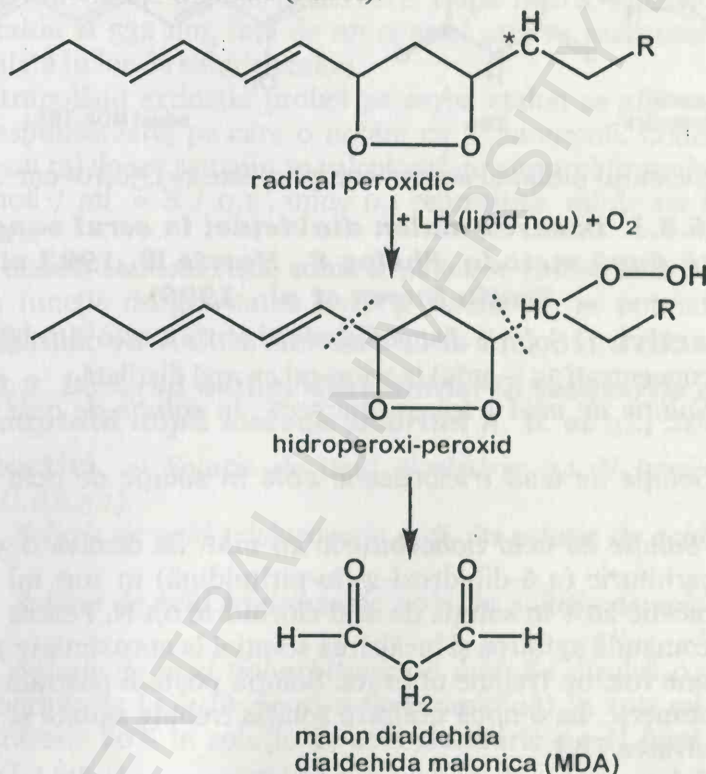
Modul de lucru. Proba de ţesut (ficat etc.) se spală de sânge cu soluţie de clorură de potasiu, se congelează în azot lichid şi se mojarează într-un mojar de porţelan până se obţine o pudră fină.

O cantitate de 1,0 -1,5 g de pudră tisulară se omogenizează timp de 15 minute într-un omogenizator de sticlă Potter-Elvehjem cu 9 ml de amestec de extracţie format din heptan şi alcool izopropilic în raportul 1:1. Suspensia obţinută se trece în eprubete de polietilenă care se închid cu dopuri pentru a evita evaporarea fazei extractante în timpul centrifugării. Eprubetele se centrifughează 10 minute la 4000 g. Supernatantul se transferă în eprubete gradate de 20 ml şi se adaugă apă distilată în proporţie de 1/10 din volumul supernatantului. După o agitare dublă şi separarea fazelor, se va preleva faza heptanică. La volume egale de 0,5 ml din faza heptanică se adaugă alcool etilic absolut în volume de la 2,5 la 5 ml. Extincţiile probelor se măsoară la 233 nm în cuve de cuarţ cu grosimea de 10 mm. În calitate de control se utilizează numai amestecul de extracţie.

Calculul rezultatelor. Conţinutul de conjugate dienice în probe se calculează, plecând de la valoarea coeficientului de extincţie molară la 233 nm pentru dienele conjugate ale acizilor graşi superiori polinesturaţi, $\varepsilon = 2{,}2.10^5.M^{-1}.cm^{-1}$ (Recknagel, Ghoshal,1966).

II.2.6.3. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A DIALDEHIDEI MALONICE CU AJUTORUL ACIDULUI TIOBARBITURIC

Peroxidarea lipidelor este un mecanism cert care cauzează leziuni celulare atât în organismele animale cât şi în plante, fiind utilizată ca un indicator al stresului oxidativ în celulele şi ţesuturile vii. Peroxizii lipidici proveniţi din acizii graşi polinesaturaţi sunt instabili şi se descompun într-o serie de compuşi carbonilici reactivi, între care predomină dialdehida malonică sau malon dialdehida (MDA):



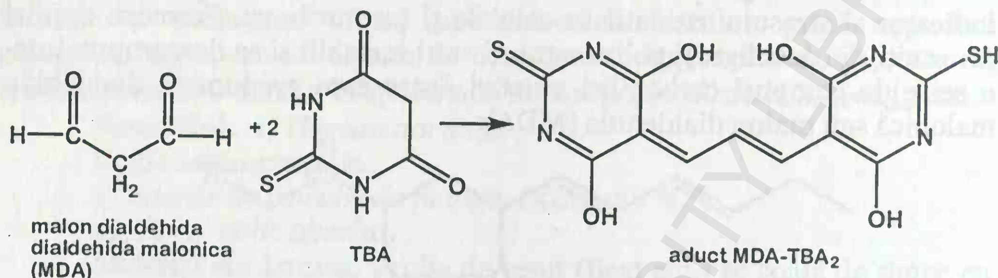
malon dialdehida
dialdehida malonica (MDA)

De aceea dozarea malon dialdehidei (MDA) este larg utilizată ca un indicator al peroxidării lipidelor şi a câştigat un loc important în practica laboratoarelor care investighează stresul oxidativ.

Nivelul produşilor de peroxidare lipidică cunoaşte o creştere importantă în diverse boli cronice întâlnite la om şi animale: procesele inflamatorii, patogeneza cancerului, ateroscleroză, îmbătrânire etc. MDA reacţionează uşor cu grupele amino libere din lanţurile polipeptidice ale proteinelor şi din alte molecule formând diferite tipuri de aducţi, inclusiv produşi cu legături încrucişate. MDA, de asemenea, formează aducţi cu bazele azotate din deoxiribonucleotidele acidului deoxiribonucleic(ADN), aducţi care posedă acţiuni mutagene şi posibil carcinogenice. Legăturile

încrucişate între ADN şi proteine sunt un alt rezultat al reacţiei dintre ADN şi MDA.

Principiul metodei. La temperatură ridicată şi în mediu acid dialdehida malonică (MDA) rezultată prin descompunerea peroxizilor lipidici reacţionează cu acidul 2-tiobarbituric (TBA) formând un aduct trimetinic MDA-TBA_2 de culoare roz care are maximul de absorbţie la 532 nm.



Coeficientul molar al acestui complex este $\varepsilon=1{,}56.10^5\ cm^{-1}.M^{-1}$.

II.2.6.3.1. Dozarea malon dialdeidei în serul sanguin (adaptată după metoda Phelps S., Harris W.,1993 şi metoda Truţia Eugen et al., 1999)

Reactivi. *1) Soluţie de acid clorhidric 0,1 N.* Se diluează 9 ml acid clorhidric concentrat(35 – 37%) la 1000 ml cu apă distilată.

2) Soluţie de acid tricloracetic 50% în soluţie de acid clorhidric 0,1N.

3) Soluţie de acid tricloracetic 20% în soluţie de acid clorhidric 0,1N.

4) Soluţie de acid tiobarbituric 26 mM. Se dizolvă 0,37479 g de acid 2-tiobarbituric (4,6-dihidroxi-2-tio-pirimidină) în 100 ml soluţie de acid tricloracetic 20% în soluţie de acid clorhidric 0,1 N. Pentru dizolvarea TBA, se recomandă agitarea şi încălzirea soluţiei la aproximativ 70°C. Dacă soluţia devine roz, nu trebuie utilizată. Soluţia poate fi păstrată 2-3 zile la 4°C şi la întuneric. La o nouă utilizare soluţia trebuie agitată şi reîncălzită pentru dizolvarea TBA.

5) Soluţie etalon de malon dialdehidă 50 nanomoli/ml. Se prepară prin dizolvarea a 4,1025 mg de 1,1',3,3'-tetrametoxipropan[malonaldehidă bis(dimetilacetal)] în 500 ml de apă bidistilată. Această soluţie se foloseşte ca soluţie etalon în loc de MDA, care este instabilă.

Modul de lucru. Se iau două eprubete de centrifugă în care se pipetează: în prima eprubetă (probă) 0,1 ml ser sanguin şi 0,1 ml apă distilată, iar în a doua eprubetă (control) 0,2 ml de apă distilată. În fiecare eprubetă se introduce câte 1 ml de soluţie de acid tricloracetic 50% în soluţie de HCl 0,1 N şi câte 1 ml soluţie de acid tiobarbituric 26 mM.

Eprubetele acoperite cu o pâlnie mică de sticlă se menţin timp de 20 minute într-o baie de apă la fierbere. După răcire, eprubetele se centrifughează timp de 10 minute la 3000 rpm.

Se citeşte extincţia supernatantului din probă (E_p) la 532 nm, faţă de supernatantul controlului.

Calculul rezultatelor. Concentraţia MDA în serul sanguin se exprimă în nanomoli/ml. Pentru aflarea cantităţii de MDA în probe se construieşte o curbă etalon cu soluţia etalon de tetrametoxipropan (reactiv 6). În acest scop se prepara o serie de etaloane conţinând între 0,05 şi 10 nanomoli într-un volum de 0,2 ml soluţie. În fiecare etalon se introduce câte 1 ml soluţie de acid tricloracetic 50% în soluţie de HCl 0,1 N şi câte 1 ml soluţie de acid tiobarbituric 26 mM.

Eprubetele acoperite cu o pâlnie mică de sticlă se menţin timp de 20 minute într-o baie de apă la fierbere. După răcire, se citeşte extincţia fiecărui etalon la 532 nm, faţă de un control care se realizează cu 0,2 ml apă bidistilată în loc de soluţie etalon.

Extrapolând extincţia probei pe curba etalon se află cantitatea de MDA corespunzătoare, pe care o notăm cu X nanomoli. Concentraţia de MDA într-un ml de ser sanguin se calculează cu ajutorul formulei:

nmoli / ml = X / 0,1 , unde 0,1 reprezintă ml de ser luat pentru determinare.

În diabet, ateroscleroză, comă hepatică se găsesc valori crescute. În cancer, în funcţie de gravitatea bolii şi stadiul ei, se pot întâlni valori crescute, dar mai ales scăzute în stadiile finale.

II.2.6.3.2. Dozarea malon dialdehidei în țesuturile animale (adaptată după metoda Dobrian A. D. et al., 2001)

Reactivi. *1) Soluţie de acid clorhidric 0,1 N* (vezi Reactiv 1, *Lucrarea II.2.6.3.1*).

2) Soluţie de acid tricloracetic 50% în soluţie de acid clorhidric 0,1N.

3) Soluţie de acid tricloracetic 20% în soluţie de acid clorhidric 0,1N.

4) Soluţie de acid tiobarbituric 26 mM. Se dizolvă 0,37479 g de acid 2-tiobarbituric (4,6-dihidroxi-2-tio-pirimidină) în 100 ml soluţie de acid tricloracetic 20% în soluţie de acid clorhidric 0,1 N (vezi Reactiv 4, *Lucrarea II.2.6.3.1*).

5) Soluţie tampon Tris-HCl 0,025 M cu pH 7,4, conţinând 0,175 M clorură de potasiu. Într-un balon cotat de 500 ml se dizolvă 1,514 g TRIS [Tris(hydroxymrthyl)aminometane] în 250 – 300 ml de apă bidistilată. În soluţia obţinută se dizolvă 6,5231 g de clorură de potasiu. Apoi, în balon se adaugă soluţie de HCl 1N până pH-ul soluţiei ajunge la valoarea de 7,4. Verificarea pH-ului se face la un pH-metru. După obţinerea pH-ului dorit, volumul soluţiei din balonul cotat se completează la 500 ml cu apă bidistilată.

6) Soluţie etalon de malondialdehidă (vezi Reactiv 5, Lucrarea *II.2.6.3.1*).

Modul de lucru. *A) PREPARAREA OMOGENTULUI TISULAR.* O cantitate de 0,1 – 0,2 g de ţesut animal (creier, ficat, muşchi etc.) se

omogenizează cu soluție tampon Tris-HCl cu clorură de potasiu (reactiv 5), în raportul 1 g țesut: 10 ml soluție tampon. Omogenizarea se face pe gheață. Omogenatul obținut se centrifughează 10 minute la 3000 rpm şi la 4°C.

Supernatantul separat se distribuie în eprubete Eppendorf şi se utilizează pentru dozarea MDA. În acelaşi supernatant se dozează proteinele prin metoda Bradford (vezi Anexa), întrucât concentrația MDA tisulare se exprimă în nmol/mg proteină solubilă.

B) DOZAREA MDA TISULARE. În două eprubete de centrifugă se măsoară: în prima eprubetă (probă) 0,2 ml supernatant obținut după centrifugarea omogenatului tisular, iar în a doua eprubetă 0,2 ml apă distilată. În ambele eprubete se adaugă câte 1 ml de acid tricloracetic 50% (reactiv 2) şi 1 ml soluție de acid tiobarbituric (reactiv 4).

Eprubetele acoperite cu o pâlnie mică de sticlă se introduc pentru 20 minute într-o baie de apă la fierbere. După răcire, eprubetele se centrifughează timp de 10 minute la 3000 rpm.

Se citeşte extincția supernatantului din probă (E_p) la 532 nm, față de supernatantul controlului.

Calculul rezultatelor. Concentrația MDA tisulare se exprimă în nmol/mg proteină solubilă.

Pentru a putea efectua calculul respectiv, se construieşte o curbă etalon aşa cum s-a descris la *Lucrarea II.2.6.3.1.* Citind extincția probei pe curba etalon, se află X nanomoli de MDA. Cantitatea de MDA într-un gram de țesut animal se calculează după formula:

nmoli MDA / g țesut = X x V/0,2 x 1/p, unde:

X - nanomoli citiți pe curba etalon;

V – volumul supernatantului, în ml, obținut prin centrifugarea omogenatului tisular;

p - cantitatea, în g, de țesut animal luată în lucru.

În final, concentrația MDA se exprimă în nanomoli/mg proteină solubilă.

II.2.6.4. DETERMINAREA INDICELUI BENZIDINIC

Triacilglicerolii, păstraţi în contact cu aerul şi cu lumina, dobândesc un gust iute şi un miros specific neplăcut, modificându-şi totodată şi calităţile nutritive. Acest proces, nedorit mai ales în industria alimentară, este cunoscut sub numele de *râncezire*. Se deosebesc mai multe tipuri de râncezire:

a) *Râncezirea hidrolitică* are loc în prezenţa umidităţii şi sub acţiunea lipazelor (EC 3.1.1.3) conducând la hidroliza parţială a triacilglicerolilor cu formarea de glicerol şi acizi graşi liberi. Punerea în libertate a acizilor graşi este urmată de creşterea indicelui de aciditate (vezi *Lucrarea II.2.3*). Sunt supuse acestui tip de râncezire triacilglicerolii vegetali nerafinaţi şi uleiurile de peşte brute, bogate în lipaze.

b) *Râncezirea cetonică* şi *aldehidică* constă în transformarea oxidativă a acizilor graşi din compoziţia triacilglicerolilor, în prima fază, la peroxizi şi hidroperoxizi nestabili care mai departe se scindează în produşi secundari de oxidare. Între aceşti produşi predomină diferite aldehide şi cetone care dau un gust şi miros neplăcut alimentelor. Acest tip de râncezire afectează cel mai frecvent untura de porc, uleiurile vegetale şi toate produsele alimentare care conţin triacilgliceroli.

Procesul de râncezire a triacilglicerolilor se produce cu atât mai repede şi mai intens cu cât ei au un conţinut mai ridicat de acizi graşi nesaturaţi.

Principiul metodei. Aldehidele rezultate în urma oxidării avansate a triacilglicerolilor reacţionează cu benzidina, în mediu slab acid, dând un produs colorat care se fotometrează la lungimea de undă de 410 nm.

Reactivi. *1) Amestec cloroform-alcool etilic absolut 2: 1.*

2) Soluţie de benzidină 0,5 % în amestec de acid acetic-alcool etilic absolut 1: 2.

Modul de lucru. Într-un flacon iodometric se cântăresc la balanţa analitică 0,3 – 0,4 g ulei vegetal. Se adaugă 10 ml amestec cloroform-alcool etilic absolut şi 2,5 ml benzidină 0,5%. Se agită în plan orizontal pentru omogenizare şi se termostatează la 50°C, timp de 60 minute. În paralel cu proba se face şi un control, în aceleaşi condiţii, care în loc de triacilglicerol (ulei vegetal) conţine 0,3 – 0,4 ml apă distilată.

Se citeşte intensitatea culorii produsului de reacţie din probă la spectrofotometru, la lungimea de undă de 410 nm, utilizând cuva de 0,5 cm drum optic, faţă de control.

Calculul rezultatelor. Indicele benzidinic (IB) se exprimă ca absorbanţă pe gram de triacilglicerol, folosind relaţia:

$IB = (12,5 \times E_{410}) / m$,

unde: E_{410} – extincţia (absorbanţa) probei la 410 nm;

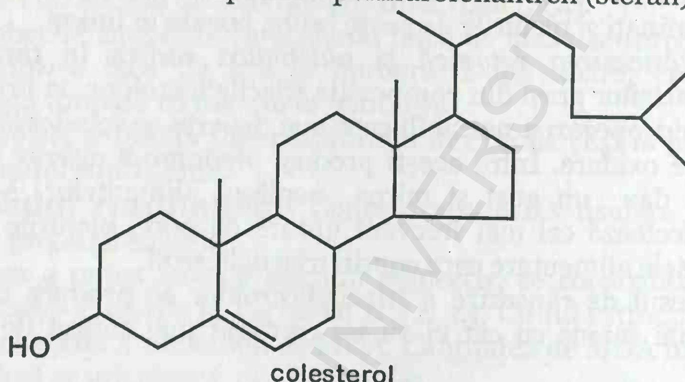
m – masa de triacilglicerol luat în analiză (g);

12,5 – volumul la care s-a adus proba.

II.3. ANALIZA STERIDELOR

Steridele sunt esteri ai sterolilor cu diferiţi acizi graşi superiori. Între sterolii existenţi în organismul omului şi animalelor superioare pe primul loc se situează *colesterolul.*

Colesterolul este un alcool monoatomic (monohidroxilic) secundar, nesaturat, derivat de la ciclopentanoperhidrofenantren (steran).



colesterol

Colesterolul se găseşte în toate ţesuturile şi lichidele organismului animal, atât liber cât şi sub formă esterificată, aceasta din urmă intrând în alcătuirea membranelor celulare. O cantitate mare de colesterol se descoperă în ţesutul nervos, corticosuprarenale, glandele sexuale, bilă, ficat, muşchi, sânge etc.

Nivelul concentraţiei colesterolului în sânge depinde de starea fiziologică a organismului uman sau animal. O creştere temporară a conţinutului de colesterol în sânge poate să survină şi prin consumarea de către organismul uman a unor produse alimentare bogate în colesterol (gălbenuş de ou, creier, ficat, rinichi, ulei de măsline etc.).

Colesterolul liber şi esterificat alcătuiesc colesterolul total. Determinarea conţinutului de colesterol total şi esterificat în sânge prezintă un interes deosebit.

II.3.1. DOZAREA COLESTEROLULUI LIBER ŞI TOTAL ÎN SERUL SANGUIN

Principiul metodei. Micrometoda de dozare directă a colesterolului liber şi total se bazează pe interacţiunea clorurii ferice în amestec de acid acetic şi acid sulfuric cu colesterolul din serul sanguin în condiţii diferite de temperatură.

Reactivi. *1) Soluţie de clorură ferică* ($FeCl_3.6H_2O$) *0,1 % în acid acetic glacial.*

2) Reactiv de culoare. La 3 volume de soluţie de clorură ferică 0,1 % în acid acetic glacial se adaugă 2 volume de acid sulfuric concentrat. Amestecul obţinut se răceşte la temperatura camerei. Se păstrează în sticlă cu dop rodat. De preferat ca reactivul de culoare să se măsoare utilizând o biuretă cu robinet de 10 ml.

3) Soluţie etalon de colesterol 200 mg %. Se dizolvă 50 mg de colesterol în 25 ml acid acetic glacial, la balon cotat.

Modul de lucru. Metoda cuprinde două etape: în prima etapă se dozează colesterolul liber, iar în alta colesterolul total, adică colesterolul liber şi esterificat.

În două eprubete obişnuite curate şi uscate se introduc câte 3 ml reactiv de culoare (reactiv 2). Cu o micropipetă se toarnă pe peretele uneia din eprubete 0,02 (0,04) ml ser sau plasmă sanguină (fără urme de hemoliză). În cealaltă eprubetă se adaugă în mod similar 0,02 (0,04) ml soluţie etalon de colesterol. Conţinutul eprubetelor se agită cu atenţie şi se lasă în repaus timp de 60 minute la +20°C (!). Măsurarea extincţiei probei şi etalonului se realizează la 560 nm, faţă de reactivul de culoare.

În paralel cu dozarea colesterolului liber, se efectuează şi dozarea colesterolului liber şi esterificat. În acest scop se utilizează alte două eprubete în care s-au pipetat câte 3 ml de reactiv de culoare. Apoi, în una din eprubete se măsoară aceeaşi cantitate de ser ca şi pentru determinarea colesterolului liber. În cealaltă eprubetă se introduce un volum de soluţie etalon identic cu cel de la colesterolul liber. Cele dou eprubete se introduc într-o baie de apă la fierbere exact pentru 60 secunde (!). Eprubetele se răcesc la temperatura camerei şi se determină extincţia amestecului de reacţie la 560 nm.

Calculul rezultatelor. Calculul cantităţii de colesterol liber sau total se efectuează conform următoarei formule :

mg colesterol liber (total) / 100 ml ser = $E_{ser} / E_{etalon} \times 200$,

unde : E_{ser} – extincţia probei cu ser pentru colesterolul liber (total) şi
E_{etalon} - extincţia probei etalon.

Cantitatea de colesterol esterificat se află scăzând din valoarea colesterolului total conţinutul de colesterol liber.

Însemnătatea clinico-diagnostică. În sângele omului sănătos, cantitatea de colesterol total (*colesterolemia*) variază între 150 – 250 mg%, iar a colesterolului liber între 40 – 90 mg%. În general, colesterolul liber reprezintă aproximativ 1 / 3 din colesterolul total. O modificare a conţinutului de colesterol se observă în funcţie de vârstă, sex, rasă, alimentaţie, echilibru neuroendocrin, profesie.

Cea mai mare parte a colesterolului seric este de origine endogenă, aportul de colesterol exogen influenţând în mică măsură colesterolemia.

Creşterea concentraţiei colesterolului în sânge (*hipercolesterolemia*) se întâlneşte în tulburări ale metabolismului lipidic,

în ateroscleroză, icter obstructiv, sindrom nefrotic, hipertiroidie, avitaminoze B, diabet zaharat, intoxicaţii acute cu diferite substanţe, pancreatite.

Scăderea concentraţiei colesterolului sanguin (*hipocolesterolemie*) se descoperă în anemii, tuberculoză, hipertiroidie, inaniţie, hepatite acute, hepatite cronice, ciroze, lezarea sistemului nervos central.

Starea sistemului endocrin al organismului uman sau al animalelor superioare manifestă o influenţă esenţială asupra nivelului colesterolului în sânge. Astfel creşterea nivelului insulinei se asociază cu scăderea colesterolului. În hipotiroidism se observă hipercolesterolemie.

Dozarea diferitelor fracţiuni ale colesterolului (total, liber şi esterificat) în serul sanguin lărgeşte considerabil posibilităţile diagnostice de cercetare a metabolismului lipidic. Se apreciază că stabilirea coeficientului de esterificare, adică a raportului între colesterolul esterificat şi colesterolul total (raport care normal are valoarea 0,6 – 0,8) serveşte ca o probă funcţională însemnată a ficatului, în care are loc sinteza colesterolului şi colesteridelor. Acest raport se micşorează odată cu apariţia celor mai vagi simptome de patologie a ficatului.

II.4. ANALIZA GLICEROFOSFATIDELOR ŞI SFINGOFOSFATIDELOR

II.4.1. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A FOSFOLIPIDELOR TOTALE DIN SERUL SANGUIN

Principiul metodei. Determinarea cantitativă a fosfolipidelor este de fapt o dozare de fosfor anorganic provenit din lipidele serice izolate în prealabil şi mineralizate. Cu ajutorul acidului tricloracetic fosfolipidele şi proteinele sunt precipitate, separate şi apoi mineralizate cu un amestec de acid azotic şi acid percloric. În lichidul rezultat în urma mineralizării se face apoi dozarea radicalului fosfat pe baza reacţiei de culoare cu reactivul fosfomolibdenic. Deoarece între proteinele circulante în ser lipsesc fosfoproteinele, tot fosforul dozat este provenit din fosfolipidele serice.

Reactivi. *1) Soluţie de acid tricloracetic 5% şi 10%.*

2) Amestec nitro-percloric. Se amestecă cu atenţie, în nişă, 1 volum de HNO_3 concentrat (ρ=1,42) cu 2 volume de acid percloric 70%.

3) Soluţie de acid sulfuric 10 N. Într-un balon cotat de 100 ml se introduc 50 ml apă distilată, se adaugă cu atenţie 30 ml acid sulfuric concentrat şi după răcirea amestecului, se completează la semn cu apă distilată.

4) Soluţie stoc de molibdat de amoniu. Se vor dizolva 5 g de molibdat de amoniu (cristalizat cu 7 molecule de apă) în 50 ml soluţie de acid sulfuric 10 N.

5) Reactiv molibdenic. Se diluează 5 ml de soluţie stoc de molibdat de amoniu cu 35 ml de apă bidistilată, se adaugă 2,5 g sulfat feros ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) şi se completează după dizolvare la 50 ml cu apă bidistilată. Se va prepara extemporaneu!

6) Soluţie stoc de fosfat conţinând 1 mg fosfor / 1 ml. Într-un balon cotat de 100 ml se dizolvă 1,155 g de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) în apă bidistilată.

7) *Soluţie etalon de fosfat conţinând 1 mg fosfor / 100 ml).* Un volum de 0,1 ml soluţie stoc de fosfat se diluează cu acid tricloracetic 10% la 10 ml (balon cotat). Un ml din această soluţie conţine 0,01 mg fosfor.

Modul de lucru. A) *PRECIPITAREA*. Într-o eprubetă de centrifugă conică, din sticlă termorezistentă, se vor introduce 0,1 ml ser sanguin şi 5 ml de apă bidistilată. Se adaugă apoi cu picătura şi sub agitare 3,5 ml soluţie de acid tricloracetic 5%.

Se centrifughează 15 minute la 3000 rot/min şi supernatantul rezultat se va îndepărta utilizând o pipetă Pasteur (efilată) având grijă să nu se antreneze şi precipitatul. Eprubetele se vor ţine cu gura în jos pe o bucată de hârtie de filtru pentru scurgerea urmelor de lichid.

B) MINERALIZAREA. Peste precipitat se vor adăuga 0,35 ml de amestec nitro-percloric şi se va încălzi, cu atenţie, eprubeta pe flacără mică, eventual pe sită de azbest. Precipitatul se va dizolva, lichidul va deveni brun, se vor degaja vapori nitroşi, apoi mediul de reacţie se va limpezi. După 10 – 15 minute de încălzire se va decolora şi vor mai rămâne circa 0,1 ml lichid în eprubetă. **ATENŢIE LA VAPORII NITROŞI CE SE DEGAJĂ! EPRUBETA VA FI SUPRAVEGHEATĂ CU ATENŢIE TOT TIMPUL MINERALIZĂRII!**

C) DOZAREA FOSFORULUI. Se va face după cum urmează:

	Probă	Etalon	Control
Reziduu de la mineralizare (ml)	0,1	-	-
Soluţie etalon de fosfat (ml)	-	1	-
Soluţie de acid tricloracetic 10%(ml)	2	1,1	2,1
Reactiv molibdenic (ml)	1,4	1,4	1,4
Se agită conţinutul eprubetelor			

După 20 minute se vor citi extincţiile probei şi standardului faţă de control la λ=750nm.

Calculul rezultatelor. Deoarece mineralizatul rămas în probă provine din 0,1 ml ser, iar soluţia etalon de fosfat conţine 0,01mg de fosfor într-un ml, putem scrie că la 100 ml de ser sanguin avem cantitatea de fosfor dată de formula :

mg P lipidic / 100 ml ser = $E_{probă} / E_{etalon} \times 0{,}01 \times 100 / 0{,}1 = E_{probă} / E_{etalon} \times 10$

Dacă înmulţim mg de fosfor lipidic cu factorul 25 vom obţine mg fosfolipide / 100 ml ser sanguin.

Valori fiziologice. La subiecţii normali conţinutul de fosfolipide în serul sanguin oscilează între 150 şi 280 mg %.

Creşterea nivelului de fosfolipide în serul sanguin se observă în diabetul zaharat, nefroze, nefrite cronice, hiperlipemie esenţială, anemii posthemoragige, ciroză biliară etc.

Scăderea conţinutului de fosfolipide se întâlneşte în ateroscleroză, distrofie alimentară şi alte afecţiuni.

II.4.2. SEPARAREA LIPIDELOR DIN MEMBRANELE BIOLOGICE PRIN CROMATOGRAFIA ÎN STRAT SUBȚIRE

Principiul metodei. Lipidele sunt extrase prin omogenizarea membranelor într-un amestec de cloroform : metanol (2:1 în volume).După îndepărtarea componentelor nelipidice din extract, acesta este concentrat prin evaporare în vid şi supus fracţionării prin cromatografie în strat subţire pe silicagel.

În cazul acestui tip de cromatografie, faza staţionară este un strat subţire de silicagel întins pe o placă de sticlă, iar faza mobilă (developantul) este un amestec de solvenţi organici. După separare lipidele sunt identificate prin reacţia de culoare cu iodul.

Reactivi. *1) Cloroform p.a.*

2) Alcool metilic (metanol) p.a.

3) Soluţie de $MgCl_2$ 0,03 %.

4) Silicagel.

5) Ghips medical.

6) Benzen.

7) Alcool etilic absolut.

8) Eter etilic.

9) Acid acetic glacial.

10) Eter de petrol.

11) Iod metalic.

12) Soluţie de acid fosfomolibdenic 10 % în etanol 96 %.

Modul de lucru. *A) EXTRACŢIA LIPIDELOR.* O cantitate de 0,25 – 0,5 ml suspensie apoasă de membrane (mitocondrii, microzomi etc.) este omogenizată cu 20 volume amestec de cloroform : metanol (2 : 1) într-un omogenizator de sticlă. Îndepărtarea componentelor nelipidice din extract se face prin extragerea lor într-o soluţie apoasă de $MgCl_2$ 0,03 %, iar faza apoasă este separată de cea organică prin centrifugare. Faza organică este concentrată la sec într-un evaporator rotativ de vid şi reluată în 1 ml amestec cloroform : metanol. Se obţine extractul lipidic al membranelor, care va fi fracţionat cromatografic.

B) FRACŢIONAREA LIPIDELOR. Plăcile pentru cromatografia în strat subţire se obţin repede prin aplicarea pe suprafaţa unor plăci de sticlă sau folii de aluminiu, curate şi degresate, a unui amestec, cu grosimea de 0,25 – 1,0 mm, alcătuit din 30 g silicagel, 3,2 g ghips medical şi 36 ml apă distilată. Acest amestec este necesar pentru prepararea unei plăci de 15×20 cm.

Plăcile cu suportul aplicat se usucă în aer, apoi se încălzesc 30 minute într-o etuvă pentru activare (temperatura să nu depăşească 100°C). Până la utilizare, plăcile cromatografice se păstrează în exsicator pentru a

nu absorbi umiditatea atmosferică. Pot fi utilizate cu rezultate foarte bune şi plăcile gata preparate, disponibile în comerţ (Fluka, Sigma, Merck etc.)

La distanţa de 2 cm de la marginea inferioară a plăcii se marchează cu creionul punctele de start sub forma unor linii orizontale de 1,5 cm, lăsând între ele o distanţă de 0,5-1 cm. Cu ajutorul unor micropipete se vor aplica pe liniile marcate volume egale din soluţia de analizat şi soluţia standard de lipide, încât zonele rezultate (spoturile) să aibă aceleaşi dimensiuni. Volumul extractului lipidic şi cel al soluţiei standard de lipide trebuie să fie de circa 25 µl în fiecare spot. După uscarea spoturilor, placa se introduce într-o cameră cromatografică paralelipipedică de sticlă de circa 25 x 25 x 10 cm, prevăzută cu capac de sticlă. În camera cromatografică se introduc 50 ml amestec de developare. Marginea de start a plăcii cromatografice se introduce 0,5 - 1 cm în faza mobilă şi se acoperă camera cu capacul. Primul developant este amestecul eter etilic : benzen : alcool etilic : acid acetic în proporţii de 40 : 50 : 2 : 0,2. Când frontul solventului a migrat până la jumătatea plăcii, aceasta se scoate din camera cromatografică. După uscarea plăcii, ea se introduce în altă cameră cromatografică în al doilea developant format din eter de petrol : eter etilic : acid acetic, în raportul 90 : 10 : 1. În acest caz se opreşte migrarea când frontul solventului a ajuns la circa 1 cm faţă de marginea superioară a plăcii (cea opusă liniei de start). Placa se va scoate din camera cromatografică, se usucă sub nişă şi apoi se introduce într-un exsicator în care se află câteva cristale de iod. După câteva minute spoturile corespunzătoare diferitelor clase de lipide se evidenţiază prin culoarea brună pe care o dau cu iodul sublimat.

Evidenţierea diferitelor lipide se poate face şi prin pulverizarea cromatogramei cu o soluţie de acid fosfomolibenic 10% în alcool etilic 96%. După pulverizare, cromatograma se încălzeşte la 80 – 100°C până la apariţia unor spoturi albastre pe fond galben.

Se vor identifica spoturile corespunzătoare diferitelor clase de lipide. Pe linia de start rămân fosfolipidele ce formează majoritatea lipidelor din compoziţia membranelor. Urmează în ordine spoturile de colesterol, monoacilgliceroli, diacilgliceroli, acizi graşi liberi, triacilgliceroli şi steride.

Interpretare. Proporţia diferitelor clase de lipide în membrane este aproximativ următoarea : fosfolipide (80-90%), colesterol (3-5%), acilgliceroli (5-10%), acizi graşi liberi (3-5%).

Fosfolipidele majore din membrane sunt : fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina sau fosfatidilcolamina (cefalina), cardiolipina (difosfatidilglicerolul). Proporţia lor este : 40-50% fosfatidilcolină, 20-30% fosfatidiletanolamină, 10-15% cardiolipină (caracteristică numai mitocondriilor). Componentele minore sunt: fosfatidilinozitolul, fosfatidilserina, lizofosfatidilcolina (lizolecitina), acidul L-α-fosfatidic.

II.5. DETERMINAREA CANTITATIVĂ A LIPOPROTEINELOR SERICE (METODA KUNKEL)

Principiul metodei. Metoda Kunkel cuprinde precipitarea lipoproteinelor serice cu fenol în prezenţa clorurii de sodiu şi evaluarea spectrofotometrică a turbidităţii amestecului de reacţie.

Reactivi. *1) Reactiv Kunkel.* O cantitate de 2,5 g fenol şi 30 g clorură de sodiu (NaCl) se dizolvă în 150-200 ml apă distilată. După dizolvarea celor două substanţe, se completează cu apă distilată la 250 ml şi se filtrează. Soluţia obţinută se conservă la frigider timp de maximum 3 săptămâni.

2) Ser fiziologic. Se dizolvă 0,9 g de clorură de sodiu în 100 ml apă distilată.

Modul de lucru. În două eprubete (probă şi control) se pipetează câte 0,2 ml ser sanguin. În probă se adaugă 3,6 ml reactiv Kunkel, iar în control 3,6 ml ser fiziologic. Se agită eprubetele şi se lasă la temperatura camerei timp de 30 minute. Apoi se agită din nou şi se citeşte extincţia probei la 650 nm în cuva de 1 cm grosime, faţă de control.

Calculul rezultatelor. În laboratoarele clinice se foloseşte exprimarea rezultatelor în unităţi Kunkel (U.K.) :

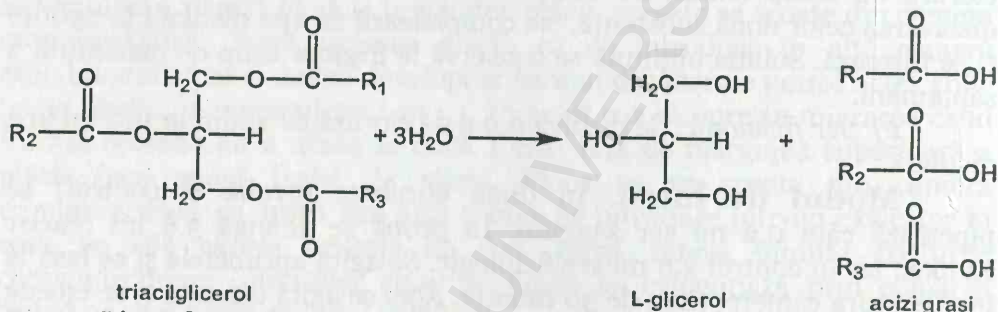
$$U.K. = E_{probă} \times 100.$$

Nivelul lipoproteinelor în serul sanguin depinde de factori genetici, de modul de viaţă şi de alimentaţie. În serul sanguin al omului sănătos, valorile normale ale lipoproteinelor sunt cuprinse între 20 – 40 unităţi Kunkel.

II.6. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME IMPLICATE ÎN METABOLISMUL LIPIDELOR

II.6.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII LIPAZEI

Lipaza (hidrolaza esterilor glicerinei, E. C. 3.1.1.3.) catalizează scindarea hidrolitică a triacilglicerolilor cu formare de glicerol şi acizi graşi liberi, conform reacţiei :



Lipazele se întâlnesc în diferite ţesuturi animale : ficat, pancreas, plămâni, rinichi, ţesutul adipos, sânge etc.

Şi în regnul vegetal lipazele sunt larg răspândite, mai ales în seminţe, în special la plantele oleaginoase. Lipazele s-au evidenţiat, de asemenea, în unele specii de microorganisme.

Lipazele de diverse provenienţe se deosebesc după activitatea catalitică, pH-ul optim de acţiune, temperatura optimă şi alte proprietăţi.

II.6.1.1. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII LIPAZEI VEGETALE

În plante există lipaze care acţionează la diferite valori de pH, deosebindu-se în acest sens lipaze acide, neutre, şi alcaline. În seminţele plantelor oleaginoase există mai ales lipaze acide şi alcaline.

Principiul metodei. Activitatea lipazei se determină după creşterea acidităţii în mediul de reacţie în urma eliberării acizilor graşi din triacilgliceroli hidrolizaţi de enzimă. Acizii graşi liberi, rezultaţi prin hidroliza triacilglicerolilor sub acţiunea lipazei, se titrează direct cu soluţie de hidroxid de sodiu :



Substratul ideal pentru studiul acţiunii lipazei dintr-un anumit organism viu ar fi triacilglicerolii obţinuţi chiar din acel organism. Dar se pot utiliza şi alţi triacilgliceroli cum ar fi uleiul de floarea soarelui sau uleiul de măsline.

Reactivi. *1) Ulei de floarea soarelui sau ulei de măsline.*

2) Soluţie tampon acetat 0,5 M cu pH 4,7. Se obţine prin amestecarea de volume egale de soluţie de acid acetic 1M şi acetat de sodiu 1M cu 2 volume de apă bidistilată.

3) Soluţie tampon borat 0,2 M cu pH 8,3. Se dizolvă 6,184 g de acid boric în 400 ml apă distilată. Se ajustează pH-ul soluţiei de acid boric la 8,3 cu soluţie de NaOH 1 N. Se completează volumul soluţiei de borat de sodiu la 500 ml cu apă distilată.

4) Soluţie de NaOH 0,1N. Se dizolvă 4,3 g NaOH în 1000 ml apă distilată, la balon cotat. Factorul soluţiei de NaOH se stabileşte cu ajutorul acidului oxalic, în prezenţa fenolftaleinei ca indicator.

5) Soluţie alcoolică de timolftaleină 1%. Se dizolvă 1 g de timolftaleină în 100 ml alcool etilic 90%.

6) Alcool etilic 96% sau alcool metilic.

7) Eter etilic.

8) Toluen.

Mod de lucru. Seminţele de plante se macină sau se triturează în mojar (cu adăugarea unei mici cantităţi de sticlă pisată). O cantitate de 2,5 g de seminţe uscate şi măcinate fin se mojarează cu 1 ml ulei pur de floarea soarelui. Pentru determinarea activităţii lipazei acide în mojar se adaugă 5 ml soluţie tampon acetat 0,5 M cu pH 4,7 şi se triturează timp de 5 -10 minute conţinutul mojarelor. În cazul determinării activităţii lipazei alcaline se folosesc 5 ml soluţie tampon borat 0,2 M cu pH 8,5. Se efectuează câte două probe.

La terminarea triturării pasta din mojare se transferă în două flacoane conice cu dop rodat, cu capacitatea de 100 ml. Mojarele se spală cu 5 ml apă distilată care se adaugă peste conţinutul din flacoane. Se introduc 5 picături de toluen, se închid flacoanele şi se agită timp de 3 - 5 minute pe un agitator automat. Apoi se introduc pentru 5 - 10 ore într-un termostat la 30°C.

După termostatare în fiecare flacon se toarnă câte 50 ml amestec alcool etilic (metilic) / eter etilic (4:1) şi se agită.

Se lasă să se depună reziduul insolubil apoi se titrează cu soluţie de NaOH 0,1N în prezenţa câtorva picături de timolftaleină.

Paralel cu probele de cercetat se vor face 2 martori în care se introduc aceleaşi cantităţi de substanţe (2,5 g făină seminţe, 1 ml ulei pur, 5 ml soluţie tampon, 5 ml apă distilată şi 5 picături de toluen) dar nu se termostatează ci se titrează direct după adăugarea amestecului alcool-eter.

Calculul rezultatelor. Activitatea lipazei se exprimă în ml soluţie de NaOH 0,1 N necesari pentru neutralizarea acizilor graşi eliberaţi sub acţiunea lipazei din 100 g seminţe :

$$X = \frac{(V - v) \cdot F \cdot 100}{p},$$

în care :

X - activitatea lipazei;

V - ml soluție de NaOH 0,1 N consumați pentru titrarea probei de cercetat ;

v - ml de soluție de NaOH 0,1 N consumați pentru titrarea martorului;

F - factorul soluției de NaOH stabilit cu ajutorul acidului oxalic ;

p - greutatea materialului analizat în grame.

II.6.1.2. DETERMINAREA ACTIVITĂȚII LIPAZEI DIN ȚESUTURILE ANIMALE

Principiul metodei este identic cu cel de la determinarea activității lipazei vegetale (*Lucrarea II.5.1.1*).

Reactivi. *1) Ulei de floarea soarelui.*

2) Soluție tampon fosfat 0,1M cu pH=7. Se amestecă 39 ml soluție de fosfat monosodic ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) 0,2 M cu 61 ml soluție de fosfat disodic ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 0,2 M și se diluează la 200 ml cu apă distilată.

3) Soluție de NaOH 0,1N . Vezi Reactivul 4 din *Lucrarea II.5.1.1.*

4) Soluție alcoolică de timolftaleină 1%. Vezi Reactivul 5 din *Lucrarea II.5.1.1.*

5) Alcool etilic (alcool metilic).

6) Eter etilic.

7) Toluen.

Mod de lucru. O cantitate de 2,5 g de țesut animal se mojarează cu 1ml ulei pur de floarea soarelui. În mojar se adaugă 5 ml soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 7 și se continuă triturarea încă 5 -10 minute. Se fac două probe.

La terminarea omogenizării, pasta din mojare se transferă în două flacoane conice cu dop rodat, cu capacitatea de 100 ml. Mojarele se spală cu 5 ml apă distilată care se adaugă peste conținutul din flacoane. Se introduc 5 picături de toluen, se închid flacoanele și se agită timp de 3 - 5 minute pe un agitator automat. Apoi se introduc pentru 1 oră în termostat la 37°C.

După termostatare în fiecare flacon se toarnă câte 50 ml amestec alcool etilic (metilic) / eter etilic (4:1) și se agită. Se lasă să se depună reziduul insolubil apoi se titrează cu soluție de NaOH 0,1 N în prezența câtorva picături de timolftaleină ca indicator.

Paralel cu probele de cercetat se vor face 2 martori în care se introduc aceleași cantități de substanțe (2,5 g țesut animal, 1 ml ulei pur, 5 ml soluție tampon, 5 ml apă distilată și 5 picături de toluen), dar nu se termostatează, ci se titrează direct cu soluție de NaOH 0,1 N după adăugarea amestecului alcool-eter.

II. 7. DOZAREA UNOR PRODUŞI INTERMEDIARI ŞI FINALI AI METABOLISMULUI LIPIDELOR

II.7.1. DOZAREA ACIZILOR GRAŞI LIBERI ÎN SERUL SANGUIN

Principiul metodei. Sărurile de cupru ale acizilor graşi formează cu dietilditiocarbamatul de sodiu un complex colorat. Intensitatea culorii este direct proporţională cu concentraţia acizilor graşi liberi din proba analizată

Reactivi. *1) Soluţie de dietilditiocarbamat de sodiu 0,1 %.*

2) Soluţie de azotat de cupru [$Cu(NO_3)_2$] 6,45 % .

3) Soluţie de trietanolamină 1 M. Se dizolvă 14,92 g de trietanolamină ($C_6H_{15}NO_3$) în apă distilată într-un balon cotat de 100 ml.

4) Acid acetic glacial.

5) Reactiv cupric. 10 volume soluţie de azotat de cupru 6,45 % se amestecă cu 9 volume soluţie de trietanolamină 1 M şi 1 volum de acid acetic glacial.

6) Cloroform p.a.

7) Soluţie etalon de acid palmitic. Cantitatea de 25,6 mg acid palmitic se dizolvă în 30 – 40 ml cloroform într-un balon cotat de 100 ml şi se completează la semn cu cloroform.

Modul de lucru. Într-o eprubetă cu dop rodat (proba) se pipetează 0,5 ml ser sanguin, iar în a doua eprubetă (etalon) 1 ml soluţie etalon de acid palmitic. În probă se adaugă apoi 5 ml cloroform, iar în etalon 4,5 ml cloroform. După agitare în ambele eprubete se măsoară câte 2,5 ml reactiv cupric. În a treia eprubetă se pregăteşte un control alcătuit din 5 ml cloroform şi 2,5 ml reactiv cupric. Cele trei eprubete se astupă cu dopuri şi se agită timp de 5 minute. Conţinutul celor trei eprubete se trece cantitativ în eprubete de centrifugă şi se centrifughează timp de 5 minute la 2000 g. În urma centrifugării suspensiile din eprubete se stratifică astfel : un strat cloroformic, un strat proteic şi unul apos. Faza apoasă superioară conţinând excesul de reactiv cupric se elimină prin sifonare, pelicula proteică se lipeşte cu atenţie de pereţii eprubetei, iar stratul cloroformic conţinând acizii graşi liberi se trece cantitativ în eprubeta obişnuită. Se adaugă apoi câte 0,5 ml soluţie de dietilditiocarbamat de sodiu şi se agită. După 10 – 15 minute se citeşte extincţia probei şi a etalonului faţă de control la 440 nm.

Calculul rezultatelor. Concentrația acizilor grași liberi, exprimată în µmoli / l, se calculează după formula:

$$C = \frac{Ep \times 1000}{Eet \times 0,5},$$

unde : Ep = extincția probei ;
Eet = extincția etalonului.

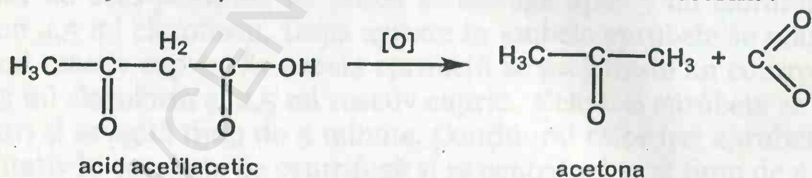
II.7.2. DOZAREA CORPILOR CETONICI ÎN SÂNGE (METODA W. NEUWEILER)

O fracţiune însemnată de acetil-CoA, rezultată prin β-oxidarea acizilor graşi şi decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic, se metabolizează pe calea procesului numit *cetogeneză* în compuşii organici, cunoscuţi sub denumirea de *corpi cetonici* : *acidul acetilacetic, acidul D-β-hidroxibutiric* şi *acetona,* care se găsesc în sângele omului şi vertebratelor în concentraţie foarte mică.

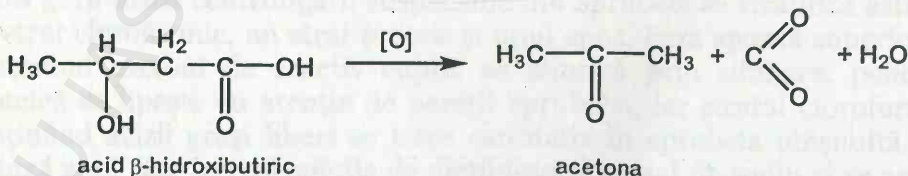
Locul de biosinteză a corpilor cetonici îl constituie ficatul. Din acest organ ei difuzează în sânge care îi transportă spre ţesuturile periferice, îndeosebi muşchii scheletici, miocard şi cortexul renal, unde sunt utilizaţi ca sursă alternativă de energie. În ficatul normal se sintetizează o cantitate mică de corpi cetonici. Însă formarea lor se intensifică apreciabil în tulburarea metabolismului glucidelor (diabet zaharat), după un aport insuficient de glucide (inaniţie), în cazurile de intoxicare cu fosfor, cloroform sau tetraclorură de carbon. În toate aceste stări patologice creşte viteza lipolizei şi rata de oxidare a acizilor graşi, conducând la o cantitate de acetil-CoA mai mare decât poate fi degradată în ciclul acizilor tricarboxilici. Creşterea conţinutului de corpi cetonici în sânge se numeşte *cetonemie*, iar apariţia lor în urină – *cetonurie*.

Formarea intensă a corpilor cetonici este dăunătoare organismului uman şi animal. Acetona manifestă influenţă nefavorabilă asupra celulei nervoase. Acumularea patologică a acizilor acetilacetic şi D-β-hidroxibutiric în sânge este asociată cu modificarea pH-ului sanguin şi intracelular în spre latura acidă (*acidoză*), ceea ce poate determina perturbarea activităţii unor enzime.

Principiul metodei. Prin oxidare cu dicromat de potasiu, acidul acetilacetic şi acidul β-hidroxibutiric se transformă în acetonă :

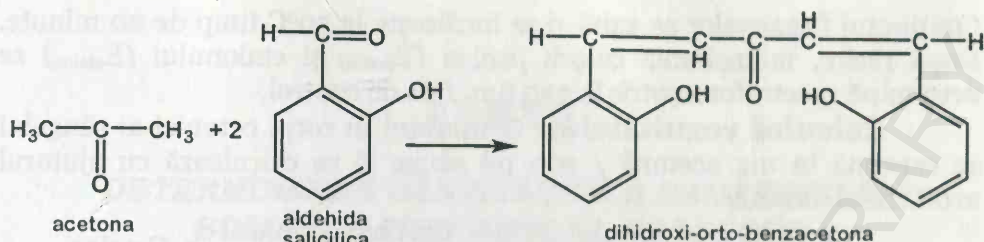


acid acetilacetic — acetona



acid β-hidroxibutiric — acetona

Acetona rezultată pe această cale, împreună cu cea preexistentă în sânge, reacţionează în mediu alcalin cu aldehida salicilică dând un compus solubil, colorat în roşu :



Intensitatea colorației se determină spectrofotometric la 530 nm.

Reactivi. *1) Soluție de wolframat de sodiu 10%.*

2) Soluție de acid sulfuric 0,66 N. Un volum de 1,98 ml acid sulfuric concentrat se adaugă la 50 ml apă distilată şi se completează la 100 ml tot cu apă distilată.

3) Soluție sulfocromică. O cantitate de 2 g de bicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$) se dizolvă în 30 ml apă distilată. La soluția obținută se adaugă, **CU ATENȚIE**, 20 ml acid sulfuric concentrat şi volumul se completează la 100 ml cu apă distilată.

4) Soluție de hidroxid de potasiu 11,3 N. Se dizolvă 63,40 g de KOH în 35 ml apă distilată. După răcirea soluției se completează volumul la 100 ml cu apă distilată.

5) Soluție alcoolică de aldehidă salicilică 10 %. Se adaugă 10 g de aldehidă salicilică la 90 ml alcool etilic 95 %.

6) Soluție etalon de acetonă 1 g / l (ρ=0,791).

Modul de lucru. Un volum de 5 ml sânge (recoltat pe anticoagulant) se diluează cu 35 ml apă distilată. La amestecul obținut se adaugă, sub agitare, 5 ml soluție de wolframat de sodiu 10% şi, încet, picătură cu picătură, 5 ml acid sulfuric 0,66 N. Se lasă în repaus 15 minute, apoi precipitatul format se separă prin filtrare.

Din filtratul obținut se măsoară 30 ml care se trec într-un balon de distilare şi se adaugă 15 ml soluție sulfocromică şi 1,5 ml acid sulfuric concentrat. Conținutul balonului se distilează timp de 25 minute, iar acetona care rezultă se colectează într-un cilindru gradat în care s-au introdus, în prealabil, 25 ml apă distilată. După distilare, volumul din cilindru se completează la 60 ml cu apă distilată.

În continuare, se realizează reacția de culoare în flacoane Erlenmeyer după următoarele indicații :

Reactivi	Probă	Etalon	Control
Soluție de acetonă distilată din cilindru gradat (ml)	20	-	-
Soluție etalon de acetonă (ml)	-	1,0	-
Apă distilată (ml)	-	19,0	20
Soluție de hidroxid de potasiu (ml)	20	20	20
Soluție alcoolică de aldehidă salicilică (ml)	10	10	10

Conţinutul flacoanelor se agită şi se încălzeşte la 50°C timp de 20 minute. După răcire, intensitatea culorii probei ($E_{probă}$) şi etalonului (E_{etalon}) se determină spectrofotometric la 530 nm, faţă de control.

Calculul rezultatelor. Conţinutul în corpi cetonici ai sângelui se exprimă în mg acetonă / 100 ml sânge şi se calculează cu ajutorul următoarei formule :

$$\text{mg corpi cetonici / 100 ml sânge} = \frac{\text{Eprobă - Econtrol}}{\text{Eetalon - Econtrol}} \times \text{Cetalor},$$

în care C_{etalon} reprezintă 5 mg acetonă %.

În calcul se ţine seama de faptul că soluţia etalon de acetonă a fost diluată în raportul 1/20, obţinându-se astfel o concentraţie de 5 mg acetonă % ; cei 20 ml din proba de analizat obţinută după distilare corespund la 1 ml sânge.

Valori normale : 1,5 – 3,5 mg % (exprimate în acetonă).

ANEXĂ

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A PROTEINELOR SOLUBILE PRIN METODA BRADFORD (BRADFORD, 1976; STOSCHECK,1990; BOLLAG, EDELSTEIN, 1991, ADAPTATĂ DE EUGEN UNGUREANU ŞI VLAD ARTENIE)

Metoda Bradford este foarte rapidă şi utilizează aproximativ aceeaşi cantitate de proteine ca şi metoda Lowry (Artenie, Tănase, 1981). Metoda este foarte precisă şi simplă, încât poate fi repetată în câteva minute.

Principiul metodei. Această metodă se bazează pe observaţia că în mediu acid colorantul Coomassie Brilliant Blue G-250 formează cu proteinele un complex având maximul de absorbţie la 595 nm. Colorantul reacţionează mai întâi cu radicalii de arginină şi pe urmă cu resturile de histidină, lizină, tirozină, triptofan şi fenilalanină din structura proteinelor.

Reactivi. *1) Alcool etilic(etanol) 96 %.*

2) Acid fosforic 89 % sau 85 %.

3) Reactiv Bradford (Soluţie de Coomassie Briliant Blue G 250). Într-un balon cotat de 100 ml se dizolvă 10 mg de Coomasie Briliant Blue G 250 în 10 ml etanol 96 %. Apoi se adaugă 9,8 ml acid fosforic 89 % (sau 10,12 ml de acid fosforic 85 %) şi după dizolvarea colorantului, se completează cu apă bidistilată la semn (100 ml). Soluţia obţinută se filtrează prin hârtie Whatman nr.1 şi poate fi stocată la temperatura camerei sau mai bine la +4°C în sticlă brună, câteva săptămâni.

4) Soluţie etalon de albumină serică bovină 5 mg %. Se dizolvă 5 mg de albumină serică bovină sau ovoalbumină în 100 ml de apă bidistilată. Un ml de soluţie etalon conţine 50 micrograme de albumină serică bovină. Se recomandă, de asemenea, utilizarea gamma-globulinei ca proteină etalon.

Modul de lucru. Într-o eprubetă de 10/100 mm se măsoară 0,1 – 0,5 ml soluţie proteică de analizat (în funcţie de cantitatea presupusă de proteină) şi se adaugă 0,4 – 0,0 ml soluţie tampon de extracţie.

În eprubetă se introduc 1,5 ml reactiv Bradford, se amestecă conţinutul cu atenţie şi se lasă la temperatura camerei.

După 5 minute, dar mai înainte de 15 - 30 minute, se citeşte extincţia probei la un spectrofotometru la lungimea de undă de 595 nm, faţă de un control al reactivilor preparat în acelaşi mod ca şi proba, cu excepţia că soluţia proteică este înlocuită cu soluţie tampon de experienţă.

Calculul rezultatelor. Pentru calcularea cantităţii de proteine în proba analizată se construieşte o curbă etalon cu concentraţii cunoscute de albumină serică bovină (ovoalbumină) sau gamma-globulină. În acest

scop se prepara o serie de etaloane conţinând între 1,0 şi 25 micrograme de proteină (albumină sau gamma-globulină) într-un volum de 0,5 ml soluţie. În fiecare etalon se introduc câte 1,5 ml reactiv Bradford, se agită, se lasă în repaus 5 minte şi se citeşte extincţia etaloanelor la 595 nm, faţă de un control al reactivilor efectuat numai cu apă bidistilată. Se recomandă ca fiecare etalon să se execute în două-trei exemplare (repetiţii). Folosirea aceleaşi cuve, presupune citirea mai întâi a etaloanelor cu concentraţie mai mică şi apoi a celor cu concentraţii mai mari, în ordinea în care au fost făcute. Pentru trasarea curbei de etalonare se vor folosi mediile extincţiilor obţinute pentru cele 2-3 repetiţii ale fiecărui etalon, trecându-le pe ordonată, iar pe abscisă se notează microgramele de proteină în etaloanele respective.

După ce se află pe curba de etalonare microgramele de proteină în proba de analizat, se calculează concentraţia de proteine în proba analizată, ţinând cont de volumul de extract utilizat şi de gradul de diluţie, dacă este cazul.

Concentraţia de proteine în proba de analizat se exprimă în mg / ml în cazul lichidelor biologice sau mg / g pentru ţesuturile animale, respectiv vegetale.

OBSERVAŢII. 1. Pentru solubilizarea proteinelor membranare şi reducerea variaţiilor de culoare de la o proteină la altă proteină, se recomandă adăugarea unui volum egal de soluţie de NaOH 1 N la fiecare probă (Stoscheck, 1990). Dacă se recurge la această opţiune, se va adăuga soluţie de NaOH şi la etaloane.

2. Întrucât colorantul aderă foarte puternic la cuvele de sticlă ale spectrofotometrului şi la eprubetele în care s-a efectuat reacţia de culoare, se recomandă spălarea acestora cu soluţie concentrată de detergent lichid, apoi cu multă apă de la robinet şi în final cu apă distilată.

PREPARAREA ŞI TITRAREA SOLUŢIEI DE NAOH 0,1N

Scop: datorită proprietăţilor sale, NaOH nu poate fi utilizat ca substanţă standard în chimia analitică, adică nu se poate prepara o soluţie de normalitate cunoscută prin simpla cântărire a substanţei la balanţa analitică urmată de dizolvarea la balon cotat. Acest lucru nu este posibil pentru că NaOH este o bază foarte puternică din care cauză reacţionează cu CO_2 atmosferic carbonatându-se. De asemenea este o substanţă higroscopică (absoarbe foarte repede apa din atmosferă) ceea ce face ca la cântărire o parte din materialul cântărit să fie reprezentat de apă, alături de carbonat şi bicarbonat de sodiu.

Principiul metodei: Se va prepara o soluţie de NaOH aproximativ 0,1N prin dizolvarea a 4g de NaOH solid într-un balon cotat de 1000 ml apoi se va stabili factorul soluţiei de NaOH cu ajutorul unei substanţe standard. Ca substanţă standard cel mai uşor este de utilizat acidul oxalic.

Reactivi: *1)* NaOH solid

2) Acid oxalic cristalizat cu 2 molecule de apă

3) Soluţie alcoolică de fenolftaleină 1% (indicator)

Mod de lucru: *A) PREPARAREA SOLUŢIEI DE NaOH APROXIMATIV 0,1.* Echivalentul gram al NaOH este dat de numărul protonilor pe care îi poate accepta. Având o singură grupare hidroxil poate accepta un singur proton de aceea echivalentul gram este M/1 adică 40g.

Acest lucru înseamnă că pentru prepararea a 1 l soluţie sunt necesari 0,1 Eg, deci 4 g NaOH solid.

Date fiind proprietăţile substanţei vom cântări la balanţa tehnică 4,1 – 4,3 g de NaOH solid şi vom dizolva substanţa într-un balon cotat de 1 l folosind ca solvent apa distilată. Pentru o mai bună stabilitate în timp este recomandată folosirea apei distilate fierte şi răcite (se elimină astfel gazele conţinute în apă care ar putea reacţiona cu NaOH influenţând factorul soluţiei).

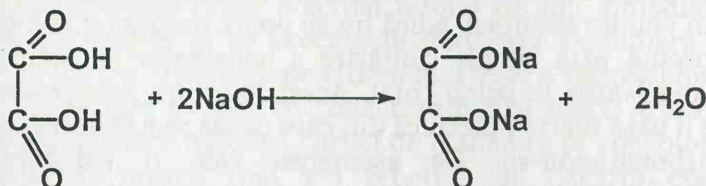
B) STABILIREA FACTORULUI SOLUŢIEI DE NaOH APROXIMATIV 0,1N.

Pentru stabilirea factorului soluţiei de NaOH se va proceda după cum urmează:

- se vor cântări la balanţa analitică (cu mare precizie) cantităţi cuprinse între 0,1 – 0,2 g de acid oxalic cristalizat cu 2 molecule de apă
- acidul oxalic cântărit va fi transvazat cantitativ în flacoane Erlenmeyer de 100 – 200 ml folosind mici cantităţi de apă distilată
- se va dizolva acidul oxalic şi se adaugă 1 – 2 picături de soluţie alcoolică de fenolftaleină
- se va titra soluţia din flacoane cu soluţie de NaOH aproximativ 0,1N până la apariţia unei coloraţii roz-pal slabă şi persistentă în timp.

- Se vor nota atât cantitatea de acid oxalic cântărit cât şi volumul de soluţie de NaOH consumat la titrare.

Calculul rezultatelor:



Deoarece reacţiile chimice decurg de la echivalent-gram la echivalent-gram, putem scrie:

$$1Eg_{C_2O_4H_2 \times 2H_2O} \text{ ------------------------------ } 1\,Eg_{NaOH}$$

$$A\,g_{C_2O_4H_2 \times 2H_2O} \text{ ------------------------------ } T_{NaOH} \times V_{NaOH}$$

$$T_{NaOH} = \frac{A\,g_{C_2O_4H_2 \times 2H_2O} \times Eg_{NaOH}}{Eg_{C_2O_4H_2 \times 2H_2O} \times V_{NaOH}}$$

Echivalentul-gram al acidului oxalic este în această reacţie M/2 (luând în calcul şi apa de cristalizare asta însemnând Eg=63g) deoarece cedează ambii protoni.

Titrul obţinut este titrul real al soluţiei de NaOH. Titrul teoretic îl aflăm folosind relaţia $C_N = \frac{T \times 1000}{Eg}$ de unde obţinem că T_{tNaOH}=0,0040. Prin urmare factorul soluţiei de NaOH este $F = \frac{N_r}{N_t} = \frac{T_r}{T_t}$.

PREPARAREA ŞI TITRAREA SOLUŢIEI DE HCl APROXIMATIV 0,1N

Scop: Acidul clorhidric (HCl) este un gaz galben – verzui cu miros înţepător specific, foarte toxic şi coroziv. Comercial el se livrează ca soluţie concentrată (*c=37% şi ρ=1,19 g/cm*^{3}) sau ca soluţii de diferite alte concentraţii.

Deoarece este un gaz, din soluţia concentrată HCl se va evapora ducând în timp la modificarea concentraţiei soluţiei din vas. Din acest motiv este necesar ca după realizarea unei soluţii de o normalitate dată, această soluţie să fie standardizată cu ajutorul unei soluţii de bază de titru cunoscut. În acest mod va fi cunoscută exact concentraţia soluţiei de HCl şi aceasta va putea fi folosită la rândul ei în alte analize (ca de exemplu determinarea durităţii apei). Standardizarea soluţiei de HCl aproximativ 0,1N se va face prin titrare cu soluţie de NaOH aproximativ 0,1N având factorul soluţiei cunoscut.

A) PREPARAREA SOLUŢIEI DE HCl 0,1N

Pentru a prepara un volum de 500 ml de soluţie de HCl 0,1N pornind de la soluţia concentrată de HCl (c=37% şi ρ=1,19 g/cm^3) vom face mai întâi calculul pentru a afla ce volum de soluţie concentrată de HCl ne este necesar.

$C_N = \frac{m_d}{Eg \times V_s}$ de unde $md = C_N \times Eg \times V_s$. Pentru reacţia dată, de neutralizare a acidului clorhidric cu hidroxid de sodiu, echivalentul gram al acidului clorhidric, ca şi cel al hidroxidului de sodiu, sunt egale cu masa moleculară a substanţei în cauză.



$$NaOH + HCl \rightarrow NaCl + H_2O$$

Asta înseamnă că: $md = 0,1 \times 36,5 \times 0,5$ adică **md=1,825** g HCl substanţă pură.

Folosind apoi formula concentraţiei procentuale: $c = \frac{md}{ms} \times 100$ se poate afla masa de soluţie de HCl concentrat $ms = \frac{md \times 100}{c}$ în care înlocuind valorile obţinem: $ms = \frac{1,825 \times 100}{37} = 4,93$ g soluţie de HCl concentrat.

Folosind apoi formula densităţii, $\rho = \frac{m}{V}$, obţinem că volumul de soluţie

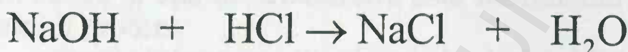
concentrată de HCl este $v=\frac{m}{\rho}=\frac{4,93}{1,19}=4,14$ ml soluţie concentrată de HCl necesari pentru a prepara (la balon cotat) un volum de 500 ml de soluţie de HCl aproximativ 0,1N. În mod practic, cu ajutorul unui cilindru gradat de 10 ml se vor măsura 5 ml de soluţie concentrată de HCl şi se vor adăuga cu atenţie peste un volum de circa 200 ml de apă distilată într-un balon cotat. Se agită bine, se completează la semn cu apă distilată şi se agită bine din nou. **ATENŢIE!!!! Operaţia de preparare a soluţiei de HCl 0,1N se va executa sub nişă!!!!**

B) TITRAREA SOLUŢIEI DE HCl APROXIMATIV 0,1N CU SOLUŢIE DE NaOH 0,1N DE FACTOR CUNOSCUT.

În flacoane de titrare (pahare Erlenmeyer) de 100 ml se vor introduce prin măsurare cu pipeta (cu exactitate între 2 diviziuni ale pipetei) volume cuprinse între 10 şi 20 ml din soluţia de HCl preparată. Se adaugă 1 – 2 picături de soluţie alcoolică de fenolftaleină (indicator), se agită, şi se titrează cu soluţie de NaOH din biuretă. Titrarea se va opri atunci când soluţia din flaconul de titrare devine roz-pal persistent.

Calculul titrului şi factorului soluţiei de HCl.

Pornind de la reacţia dintre HCl şi NaOH şi de la volumele de soluţie utilizate, precum şi de la factorul soluţiei de NaOH, putem afla factorul soluţiei de HCl.



$$NaOH + HCl \rightarrow NaCl + H_2O$$

Deoarece reacţiile chimice decurg de la echivalent-gram la echivalent-gram, înseamnă că putem scrie:

$$1Eg_{NaOH} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots 1Eg_{HCl}$$

$$40g_{NaOH} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots 36,5g_{HCl}$$

$$T_{rNaOH} \times V_{NaOH} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots T_{rHCl} \times V_{HCl}$$

$$F_{NaOH} \times T_{tNaOH} \times V_{NaOH} \ldots\ldots\ldots\ldots T_{rHCl} \times V_{HCl}$$

de unde obţinem că:

$$T_{rHCl}=\frac{F_{NaOH} \times T_{tNaOH} \times V_{NaOH} \times 36,5}{40 \times V_{HCl}}$$

Valoarea titrului teoretic pentru acidul clorhidric aproximativ 0,1N se obţine prin aplicarea relaţiei:

$C_N=\frac{T\times1000}{Eg}$ de unde $T=\frac{C_N\times Eg}{1000}$. În cazul HCl şi al reacţiei date valoarea este $T_t=\frac{0,1\times36,5}{1000}=0,00365$. Pentru NaOH valoarea titrului teoretic se află după aceeaşi formulă fiind $T_{tNaOH}=0,0040$.

Factorul soluţiei de HCl fiind $F_{HCl}=\frac{T_{rHCl}}{T_{tHCl}}=\frac{T_{rHCl}}{0,00365}$.

IODOMETRIA

Dozările iodometrice au la bază acţiunea oxidantă a iodului elementar care decurge conform reacţiei:



Este de remarcat faptul ca în multe din dozările iodometrice, nu se titrează cu soluţie de iod de normalitate cunoscută nici nu se adaugă în mediul de reacţie soluţie de iod de normalitate cunoscută, ci iodul este obţinut cantitativ în mediul de reacţie prin diferite reacţii.

Însă iodul rezultat sau adăugat în mediul de reacţie va fi titrat întotdeauna cu soluţie de tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3$).

Reactivi:

1. Tiosulfat de sodiu cristalizat cu cinci molecule de apă ($Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$).
2. Iodură de potasiu (KI).
3. Acid clorhidric 2N (HCl).
4. Dicromat de potasiu ($K_2Cr_2O_7$).
5. Amidon solubil.

Mod de lucru

A) PREPARAREA SOLUŢIEI DE TIOSULFAT DE SODIU 0,1N

Se vor cântări la balanţa tehnică aproximativ 25 g $Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$ şi se vor dizolva în circa 500 ml de apă distilată fiartă şi răcită pentru eliminarea completă a dioxidului de carbon şi a oxigenului dizolvate în apă. Acestea pot descompune tiosulfatul de sodiu conform reacţiilor de mai jos. După dizolvarea completă se va completa la semn cu apă distilată fiartă şi răcită şi se va omogeniza soluţia obţinută. După o săptămână se poate determina titrul soluţiei de tiosulfat de sodiu.





Titrul soluţiei de tiosulfat se poate determina cu $K_2Cr_2O_7$, I_2, $KBrO_3$, $KMnO_4$.

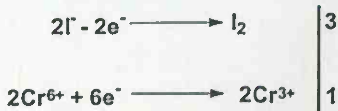
B) DETERMINAREA TITRULUI CU AJUTORUL DICROMATULUI DE POTASIU.

Reacţia redox care stă la baza metodei este următoarea:



Reacţia A

Sistemele redox implicate în această reacţie sunt următoarele:



Sistem redox A

Iodul pus în libertate se titrează cu ajutorul tiosulfatului de sodiu în prezența amidonului ca indicator, conform reacției:

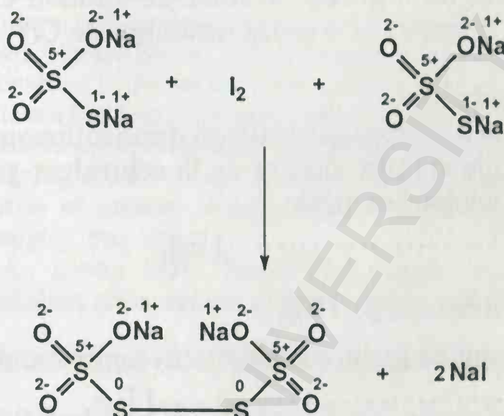


Reacția B





Sistem redox B



Produșii reacției sunt iodura de sodiu (NaI) și tetrationatul de sodiu ($Na_2S_4O_6$).

Din sistemele redox A și B rezultă că: $Eg_{K_2Cr_2O_7} = \frac{M_{K_2Cr_2O_7}}{2 \times 3}$

deoarece în molecula dicromatului de potasiu există 2 atomi de crom fiecare acceptând câte 3 electroni. În valoare numerică, $Eg_{K_2Cr_2O_7} = 49,037g$, respectiv $Eg_{Na_2S_2O_3} = \frac{M_{Na_2S_2O_3}}{1}$ deoarece anionul tiosulfat cedează doar 1 electron, în valoare numerică $Eg_{Na_2S_2O_3} = 158g$ sau $Eg_{Na_2S_2O_3 \times 5H_2O} = 248g$.

C) PREPARAREA SOLUȚIEI DE DICROMAT DE POTASIU

Se cântăresc la balanța analitică 0,49037 g dicromat de potasiu și se introduc într-un balon cotat de 100 ml, se dizolvă și se completează la semn cu apă distilată și soluția se omogenizează.

D) PREPARAREA SOLUȚIEI DE AMIDON 1%

Se cântăresc la balanța tehnică 1 g de amidon solubil care se suspendă în 20 ml de apă distilată. Într-un flacon se pun 80 ml de apă distilată și flaconul se pune la fiert. Când lichidul ajunge la fierbere, peste el se toarnă suspensia de amidon. Se lasă să fiarbă încă circa 3 – 5 minute apoi se lasă să se răcească apoi se poate utiliza ca indicator în titrările iodometrice.

E) DETERMINAREA TITRULUI

Din soluţia obţinută se iau volume EXACT măsurate cu pipeta şi se introduc în flacoane Erlenmeyer. Se adaugă 15 ml soluţie de iodură de potasiu 10% şi 15 ml soluţie de HCl 2N, se agită cu atenţie pentru omogenizare şi se acoperă flaconul cu o hârtie şi se lasă la întuneric 10 minute.

După trecerea timpului se spală pereţii flaconului cu apă distilată apoi se va titra cu soluţie de tiosulfat de sodiu 0,1N până când conţinutul flaconului devine galben-verzui. Se adaugă apoi 1 ml soluţie de amidon 1% şi se continuă titrarea până la dispariţia completă a coloraţiei albastru-închis a compusului de adsorbţie format de amidon cu iodul. Coloraţia finală a soluţiei va fi verzuie din cauza cationilor de Cr^{3+} prezenţi în soluţia finală.

Calculul rezultatelor

Titrul soluţiei de tiosulfat se calculează după raţionamentul:

Ştiind că reacţiile chimice decurg de la echivalent-gram la echivalent-gram, putem scrie pentru reacţia A:

$$1Eg_{K_2Cr_2O_7} \cdots\cdots\cdots\cdots 1Eg_{I_2}$$

respectiv pentru reacţia B: $1Eg_{I_2} \cdots\cdots\cdots\cdots 1Eg_{Na_2S_2O_3}$

ceea ce înseamnă că (prin tranzitivitate) pentru ambele reacţii putem scrie: $1Eg_{K_2Cr_2O_7} \cdots\cdots\cdots\cdots 1Eg_{Na_2S_2O_3}$

sau

$$49{,}037g\ K_2Cr_2O_7 \cdots\cdots\cdots\cdots 248g\ Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$$

$T_{K_2Cr_2O_7} \times V_{K_2Cr_2O_7} \cdots\cdots\cdots\cdots T_{r\,Na_2S_2O_3} \times V_{Na_2S_2O_3}$ de aici:

$$T_{r\,Na_2S_2O_3} = \frac{T_{K_2Cr_2O_7} \times V_{K_2Cr_2O_7} \times Eg_{Na_2S_2O_3}}{Eg_{K_2Cr_2O_7} \times V_{Na_2S_2O_3}} = \frac{V_{K_2Cr_2O_7}}{V_{Na_2S_2O_3}} \times T_{K_2Cr_2O_7} \times \frac{248}{49{,}037}$$

Dar pentru prepararea soluţiei de dicromat s-au cântărit 0,49307g de dicromat pentru 100 ml de soluţie, ceea ce înseamnă că titrul soluţiei este egal cu: $T_{K_2Cr_2O_7} = 0{,}0049037\ g/ml$.

Stabilirea factorului soluţiei de tiosulfat de sodiu se va face luându-se în considerare că normalitatea teoretică este de 0,1 ceea ce înseamnă că titrul teoretic este:

$$T_{t\,Na_2S_2O_3} = \frac{\text{normalitatea} \times Eg_{Na_2S_2O_3}}{1000} = \frac{0{,}1 \times 248}{1000} = 0{,}0248$$

Normalitatea este raportul dintre titrul real şi cel teoretic:

$$F = \frac{T_{r\,Na_2S_2O_3}}{T_{t\,Na_2S_2O_3}}$$

BIBLIOGRAFIE

Artenie Vlad, 1970 – **Lucrări practice de chimie biologică**. Centrul de Multiplicare al Universităţii „ Alexandru Ioan Cuza ", Iaşi, 164 p.

Artenie Vlad, 1991 – **Biochimie.** Editura Universităţii „Alexandru Ioan Cuza", Iaşi, 398 p.

Artenie G. Vlad, Artenie Vl. Romeo, 1999 – **Introducere în metabolismul lipidelor**. MatrixRom, Bucureşti, 96 p.

Artenie Vlad şi Mihăşan Marius, 2007 – Procedeu de evidenţiere a izoenzimelor α-amilazei şi β-amilazei. *Date nepublicate*

Artenie Vlad, Tănase Elvira, 1981 – **Practicum de biochimie generală.** Centrul de Multiplicare al Universităţii „ Alexandru Ioan Cuza ", Iaşi, 291 p.

Băbeanu Ileana Cristina, Glodeanu Elena, Marinescu Gabriela, Ciobanu Georgeta, 2003 – **Biochimie vegetală practică.** Editura INFO, Craiova, p. 68

Bradford M. M., 1976 – A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72,** 248

Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J., 1946 – A method for rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic milimeters of serum. *J.Biol. Chem.*, **164**, 321

Bollag D. M., Edelstein S. J, 1991 – **Protein methods**, Wiley-Liss, New York, p 50

Cojocaru Dumitru , 2005 – **Enzimologie practică**. Editura Tehnopres, Iaşi, 466 p.

Darie Costel, 1997 – Studiul activităţii glutation peroxidazei la pacienţii cu unele afecţiuni psihice. *Lucrare de licenţă* (Conducător ştiinţific : Prof. dr. Vlad Artenie), Universitatea „Alexandru Ioan Cuza" Iaşi, p.31

Dobrian A.D., Davies M.J., Schriver S.D., Lauterio T.J., Prewitt R. L., 2001 – Oxidative stress in rat a model of obesity-induced hypertension. *Hypertension*, 554 – 560

Dumitru I.F., 1967 - **Lucrări practice de biochimie**. Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, p. 227

Fukuzawa K., Tokumura A. – Glutathione peroxidase activity in tissues of vitamin E-deficient mice. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 1976, **32,** 405 – 407

Gudkova L. V., Degtiari R. G., 1968 – Metod opredelenija aktivnosti peroxidazî. În kn. : **Fermentî v mediţine, pişcevoi promîşlennosti i v sel'skom hoziastve.** „Naukova dumka", Kiev

Iordăchescu Dana, Dumitru I.F., 1988 – **Biochimie practică.** Universitatea din Bucureşti, 288 p.

Ivanov I.I., Korovkin B.F., Markelov I.M.,1974 – **Vvedenie v kliniceskuiu enzimologhiu.** „Mediţina", Leningrad, 277 p.

Lukomskaya I.S.,1977 – Opredelenie aktivnosti disaharidaz v slizistoi kişecinika celoveka. In : **Sovremennîe metodî v biohimii.** Pod Red. V. N. Orehovicia, „Meditzina", Moskva, s. 127

Manta I., Cucuianu M., Benga G., Hodârnău A., 1976 – **Metode biochimice în laboratorul clinic.** Editura Dacia, Cluj-Napoca, p. 324

Neuweiler W., 1933 - .... *Klin. Woch.*, p.869

Oberbacher M. F. and Vines H. M., 1963 – Assay Procedure Ascorbate Oxidase. *Nature*, **197**, 1203

Padh H., 1992 – Organelle isolation and marker enzyme assay, *în* **Tested studies for laboratory teaching**, Volume 13 (C. A. Goldman, Editor), Proceedings of the 13th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), p.129

Phelps S., Harris W., 1993 – Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. *Lipids*, Vol.28, No.5, 475 - 477

Popescu O. V.,1990 – **Electroforeza proteinelor în geluri de poliacrilamidă.** Editura Tehnică, Bucureşti, p.89

Plummer D.T., 1989 – **Introduction aux techniques de biochimie.** McGraw-Hill, Paris, p.177

Recknagel R. O., Ghoshal A. K.,1966 – Lipoperoxidation of rat liver microsomal lipids by carbon tetrachloride. *Nature*, vol.210, 1162

Sinha A. K., 1972 – Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem*, **47**, 389

Stoscheck C.M., 1990 – Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, **182**, 50

Sumner J. B. and Somers G. F., 1943 – **Chemistry and methods of enzymes**. Academic Press, Inc., New York

Şerban M., Câmpeanu G., Ionescu Emanuela, 1993 – **Metode de laborator în biochimia animală.** Editura Didactică şi Pedagogică, R.A., Bucureşti, 1993, p. 172

Truţia Eugen, coordonator, 1999 - **Biochimie medicală. Manual de laborator**. Editura Tehnoplast Company S.R.L., Bucureşti, p.228

Ungureanu Eugen, 1996 – Studiul cantitativ şi calitativ al proteinelor solubile din unele organe ale stejarului (*Quercus robur*). *Lucrare de licenţă* (conducător ştiinţific Vlad G. Artenie), Universitatea „Alexandru Ioan Cuza", Iaşi, p.25

Winterbourn C., Hawkins R., Brian M. and Carrell R., 1975 – The Estimation of Red Cell Superoxide Dismutase Activity.*J. Lab. Clin. Med.*, **85**, 337

Wood E.J., Editor, 1989 – **Practical biochemistry for colleges.** Pergamon Press, Oxford, p. 42

Wűst H., Schőn H. und Berg G.,1962 – Isoenzyme der Lactatdehydrogenase (LDH) und ihre thermische Inaktivierung in der Diagnose innerer Krankheiten. *Klin. Wschr.*, **40**, 1169

Tipar Digital realizat la **Tipografia** pim
Şoseaua Ştefan cel Mare nr. 11
Iaşi – 700498
Tel./fax: **0232-212740**
e-mail: **editurapim@pimcopy.ro**
www.pimcopy.ro




pim®


ISBN 973-716-895-X
9 789737 168955


250
200